

MARIJO ČIČAK

**RAZVOJ SINTETSKE METODE ZA PRIPRAVU  
DIMANOZILIRANIH DESMURAMILPEPTIDA**

**Diplomski rad**

**Zagreb**

**2016.**

MARIJO ČIČAK

**RAZVOJ SINTETSKE METODE ZA PRIPRAVU  
DIMANOZILIRANIH DESMURAMILPEPTIDA**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog stupnja

magistra kemije

**Zagreb**

**2016.**

*Ovaj diplomski rad izrađen je pod mentorstvom doc. dr. sc. Rosane Ribić na Zavodu za organsku kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu.*

## **Zahvala**

*Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Rosani Ribić na pruženoj prilici, uloženom trudu i vremenu, prenesenom znanju i vještinama.*

*Također se zahvaljujem izv. prof. doc. dr. sc. Vesni Petrović Pekorović na ugodnom društvu i korisnim savjetima. Veliko hvala dr. sc. Željki Car kao i svim djelatnicima Zavoda za organsku kemiju. Hvala prof. dr. sc. Srđanki Tomić-Pisarović na mogućnosti izrade diplomskog rada u njenom laboratoriju.*

*Veliko hvala kolegama s faksa na zajedničkim druženjima, te članovima Znanstvenih čarolija s kojima sam odradio puno radionica za djecu i nešto ih naučio.*

*Na kraju, najveća hvala mojoj obitelji, roditeljima i sestrama, koji su bili uz mene svo vrijeme moga studiranja.*

# Sadržaj

SAŽETAK.....	I
ABSTRACT .....	II
1. UVOD .....	1
2.LITERATURNI PREGLED.....	3
2.1. MURAMILDIPEPTID I NJEGOVI DERIVATI.....	4
2.1.2. Manozni derivati desmuramildipeptida.....	5
2.2.PRIPRAVA <i>O</i> -GLIKOZIDA .....	7
2.2.1. Zaštita hidroksilnih skupina .....	8
2.2.2. Stereokemija sinteze glikozida .....	10
2.2.3. Metode priprave <i>O</i> -glikozida .....	13
2.3. SINTEZA PEPTIDA .....	16
2.3.1. Zaštitne skupine u sintezi peptida.....	18
2.3.2. Reakcija kondenzacije aminokiselina.....	19
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	22
3.1. MATERIJALI I METODE.....	23
3.2. ACETILIRANJE $\alpha$ -D-(+)-MANOPIRANOZE.....	24
3.2.1. 1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza ( <b>1</b> ).....	24
3.2.2. 2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza ( <b>2</b> ) .....	25
3.3. SINTEZA <i>O</i> -MANOZIDA .....	25
3.3.1. <i>Tert</i> -butil-2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetat ( <b>3</b> ).....	25
3.3.2. 2-(2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octena kiselina ( <b>4</b> ).....	26
3.4. PRIPRAVA BENZILNOG ESTERA L-LIZINA.....	27
3.4.1. Di- <i>p</i> -toluensulfonat benzilnog estera L-lizina ( <b>5</b> ).....	27
3.5. SINTEZA DIMANOZILIRANOG LIZINA .....	27
3.5.1. Benzilni ester (2 <i>S</i> )-2,6-di[2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanske kiseline ( <b>6</b> ) .....	27
3.5.2. (2 <i>S</i> )-2,6-Di[2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanska kiselina ( <b>7</b> ).....	28
3.6. KONDENZACIJA DIMANOZILIRANOG L-LIZINA S DESMURAMILDIPEPTIDOM.....	29
3.6.1. Benzilni ester (2 <i>S</i> )-2,6-di[2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanoil-L-alanil-D-izoglutamina ( <b>8</b> ).....	29
3.7. DEPROTEKCIJA ZAŠTIĆENOG DIMANOZILIRANOG DESMURAMILDIPEPTIDA .....	30
3.7.1. (2 <i>S</i> )-2,6-Di[2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanoil-L-alanil-D-izoglutamin ( <b>9</b> ) .....	30
3.7.2. (2 <i>S</i> )-2,6-Di[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanoil-L-alanil-D-izoglutamin ( <b>10</b> ) .....	30

4. REZULTATI I RASPRAVA .....	32
4.1. SINTEZA DIMANOZILIRANOG LIZINA .....	33
4.1.1. Priprava tetra-acetilirane $\alpha$ -D-manopiranoze .....	33
4.1.2. <i>O</i> -manoziliranje octene kiseline .....	34
4.1.3. Sintaza di- <i>p</i> -toluenesulfonat benzilnog estera L-lizina.....	35
4.1.4. Kondenzacija 2-(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octene kiseline s benzilnim esterom di- <i>p</i> -toluenesulfonat L-lizinom .....	36
4.2. SINTEZA DIMANOZILIRANOG DESMURAMILDIPEPTIDA .....	37
4.2.1. Sintaza (2 <i>S</i> )-2,6-di[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanoil-L-alanil-D-izoglutamina .....	37
5. ZAKLJUČAK .....	41
6. LITERATURNI VRELICI .....	43
7. ŽIVOTOPIS .....	III
8. PRILOZI .....	V
8.1. POPIS KRATICA I SIMBOLA .....	VI

**RAZVOJ SINTETSKE METODE ZA PRIPRAVU DIMANOZILIRANIH DESMURAMILPEPTIDA**

MARIJO ČIČAK

Zavod za organsku kemiju, Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet,  
Sveučilište u Zagrebu, Horvatovac 102A, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Lektini su komplementarni proteini koji specifično prepoznaju ugljikohidrate. Dije se na pet osnovnih skupina s obzirom na šećer prema kojem pokazuju najveći afinitet. Jedna od skupina lektina su manozni receptori (MR) koji specifično prepoznaju manozu. Nalaze se na površini endotelne stanice te na makrofagima, a imaju ulogu u urođenoj imunosti. Dokazano je da ligandi s dvije ili više manoznih podjedinica, pokazuju povećani afinitet prema lektinima. Vezanjem manoze na imunostimulatorne (adjuvantske) supstance moguće je pojačati njihovu aktivnost. Muramildipeptid (MDP, *N*-acetilmuramil-L-Ala-D-*iso*Gln) najmanja je strukturna jedinica peptidoglikana koja pokazuje imunostimulatornu (adjuvantsku) aktivnost. Obzirom da se MDP slabo unosi u makrofage i brzo eliminira, te pokazuje pirogeno i artritogeno djelovanje, dizajniraju se novi imunomodulatori s poboljšanim farmakološkim svojstvima. U sklopu ovog rada razvijena je sintetska metoda za pripremu dimanoziliranih derivata desmuramilpeptida s potencijalnom adjuvantskom aktivnošću. Učinkovitost metode dokazana je na pripremi (2*S*)-2,6-di[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanoil-L-alanil-D-izoglutamina (10). Prvo je sintetizirana 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octena kiselina supstitucijom broma iz *t*-butil-bromacetata s tetraacetiliranom manozom  $\alpha$ -konfiguracije. Dobivenom manozidu je uklonjena esterska zaštita s karboksilne skupine preko koje je potom karbodiimidnom metodom uz EDC/HOBt aktivaciju vezan benzilni ester L-lizina. Nakon uklanjanja benzilne zaštite s lizina dobivena je (2*S*)-2,6-di[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanska kiselina koja je konjugirana s desmuramildipeptidom, benzilnim esterom L-alanil-D-izoglutamina. U posljednjoj fazi uklonjene su zaštitne skupine, acetatne zaštite s manoznih podjedinica te benzilna zaštita s D-izoglutamina. Svi sintetizirani spojevi su strukturno okarakterizirani NMR spektroskopijama, spektrometrijom mase, a neki od njih i IR spektroskopijom.

(57 stranica, 10 slika, 19 shema, 3 tablice, 23 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102A, 10 000 Zagreb, Hrvatska

**Ključne riječi:** adjuvant, desmuramildipeptid, manoz, lizin

**Mentor:** Doc. dr. sc. Rosana Ribić

**Ocjenitelji:** Izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Pekorović

Izv. prof. dr. sc. Biserka Prugovečki

Izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić

**Zamjena:** Prof. dr. sc. Srđanka Tomić-Pisarović

**Rad je prihvaćen:** 07. prosinca 2016.

**DEVELOPMENT OF THE SYNTHETIC METHOD FOR THE PREPARATION OF  
DIMANNOSYLATED DESMURAMYLPEPTIDES****MARIJO ČIČAK**Division of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac  
102A, 10 000 Zagreb, Croatia

Lectins are complementary proteins that specifically recognise carbohydrates. They can be divided into five major groups, depending on the sugar towards they have biggest affinity. One of those are mannose receptors (MR) which specifically recognise mannose. They are located on the surface of endothelial cells and on macrophages and they participate in innate immunity. It is proven that ligands with two or more mannose subunits exhibit increased affinity towards lectins. Binding of mannose on an immunostimulant can increase their adjuvant activity. Muramyl dipeptide (MDP, *N*-acetylmuramyl-L-Ala-D-isoGln) is the smallest peptidoglycan structural unit that show adjuvant activity. Since MDP is characterized with low uptake into macrophages, fast elimination also pyrogenic and arthritogenic activity, new immunomodulators with improved pharmacological properties are being designed. In the scope of this Diploma Thesis, novel method for synthesis of dimannosylated desmuramylpeptide with potential adjuvant activity was developed. Effectiveness of the method was proven on the synthesis of (2*S*)-2,6-di[2-( $\alpha$ -D-mannopyranosyloxi)acetyl-amino]hexanoyl-L-alanyl-D-isoglutamine (10). At first, 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxi)acetic acid was synthesized by the substitution of bromine from *t*-butyl-bromoacetate with  $\alpha$ -anomer of tetraacetylated mannose. After the ester protection was removed, benzyl ester of L-lysine was connected to the mannoside using the EDC/HOBt carbodiimide method. Removal of benzyl protection from the lysine resulted with (2*S*)-2,6-di[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosyloxi)acetyl-amino]hexanoic acid which was then conjugated with desmuramyl dipeptide, benzyl ester of L-alanyl-D-isoglutamine. Protection groups were removed in the final phase; acetate protections from mannose subunits and benzyl protections from D-isoglutamine. All synthesised compounds are structurally characterised with NMR spectroscopy, mass spectroscopy, with some of them also with IR spectroscopy.

(57 pages, 10 figures, 19 schemes, 3 tables, 23 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102A, 10 000 Zagreb, Croatia

**Keywords:** adjuvant, desmuramyl dipeptide, mannose, lysine**Mentor:** Dr. Rosana Ribić, Asst. Prof.**Reviewers:** Dr. Vesni Petrović Pekorović, Assoc. Prof.

Dr. Biserka Prugovečki, Assoc. Prof.

Dr. Iva Juranović Cindrić, Assoc. Prof.

**Replacement:** Prof. Dr. Srđanka Tomić-Pisarović**Thesis accepted:** 07<sup>th</sup> December 2016



## **1. UVOD**

## 1. UVOD

Imunostimulatori, poznati i kao adjuvanti (lat. *adiuvare* – pomagati), dodaju se cjepivima kako bi se ubrzala, produljila ili pojačala specifična imunoreakcija na određeni antigen. Veliki potencijal pokazali su peptidni adjuvanti – derivati muramildipeptida. Muramildipeptid, *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin (MDP), razgradni produkt je prirodnog polimera peptidoglikana koji izgrađuje staničnu stijenu bakterija. MDP je najmanji strukturni dio peptidoglikana koji pokazuje imunostimulatornu aktivnost. Zbog svoje pirogenosti i ostalih nuspojava MDP se klinički ne može upotrebljavati. Priređen je velik broj apirogenih derivata i analoga muramildipeptida, ali i desmuramildipeptida (analozi bez šećerne podstrukture). Vrlo važnom modifikacijom pokazala se i manozilacija desmuramildipeptidnih adjuvanata, zbog toga što se uvođenjem manoze omogućuje njihova interakcija s manoznim receptorima koji sudjeluju u regulaciji imunološkog odgovora. Primjerice, manozni desmuramilpeptidi s adamantanskim podjedinicama su apirogeni i netoksični spojevi koji su pokazali izražena imunomodulatorska svojstva. Mogu se upotrijebiti za pripremu manoziliranih liposoma u kojima se adamantan ugrađuje u lipidni dvosloj liposoma, dok manaza na površini može stvarati interakcije s manoznim receptorima. Na taj način se omogućuje ciljana dostava aktivnih tvari do imunokompetentnih stanica.

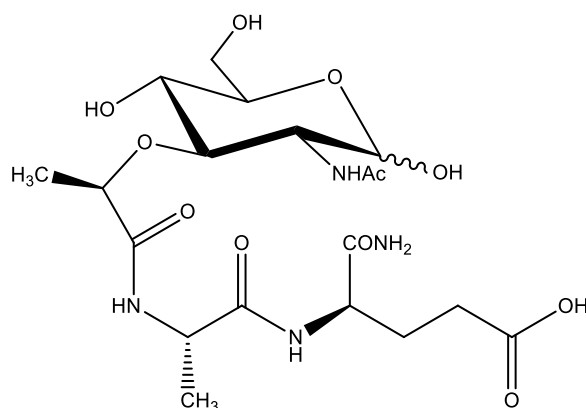
Cilj ovog rada je razvoj sintetske metode za pripremu dimanoziliranih derivata desmuramildipeptida s potencijalnom adjuvantskom aktivnošću. Obzirom da se dimanozilirani ligandi jače vežu na manozne receptore, očekujemo da će se uvođenjem dvije manozne podjedinice dodatno pojačati adjuvantska aktivnost desmuramilpeptida. Uspješnost metode prikazana je sintezom (2*S*)-2,6-di[2-( $\alpha$ -D-manopiranozilo)acetilamino]heksanoil-L-alanil-D-izoglutamina. Na *N*-kraj desmuramildipeptida, L-Ala-D-*iso*Glu, vezan je L-lizin s ciljem da se omogući vezanje dviju molekula  $\alpha$ -D-manopiranoze preko dvije amino-skupine lizina. Veza između manoze i lizina ostvarena je posredno, preko poveznice od dva ugljikova atoma koja je prethodno pripravljena *O*-glikozilacijom octene kiseline. U sintezi ciljne molekule korišteni su standardni postupci pripreme peptida i glikozida. Identifikacija konačnog produkta, kao i svih međuprodukata, provedena je spektrometrijom masa te  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijama, dok su neki od spojeva dodatno okarakterizirani i IR spektroskopijom.

## **2.LITERATURNI PREGLED**

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. MURAMILDIPEPTID I NJEGOVI DERIVATI

Muramildipeptidi su integrirani dijelovi peptidoglikana staničnih stjenki Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Peptidoglikani su prirodni polimeri građeni od alternirajućih molekula *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) i *N*-acetilmuraminske kiseline (MurNAc) međusobno povezanih  $\beta(1\rightarrow4)$  glikozidnom vezom, a umreženih preko kratkih peptida koji obično sadrže četiri do pet aminokiselina vezanih na MurNAc.[1,2] *N*-acetilmuramil-L-alanil-D-izoglutamin (MDP) najmanja je strukturna podjedinica peptidoglikana koja pokazuje imunostimulatornu aktivnost, odnosno djeluje kao adjuvant.



Slika 1. Muramildipeptid (MDP)

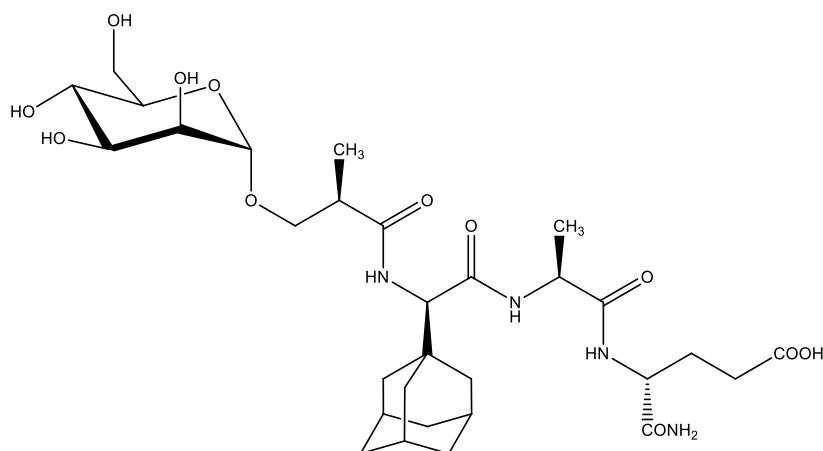
Adjuvanti su tvari koje ubrzavaju, produžuju ili pojačavaju imunološki odgovor organizma na određeni antigen i stoga se dodaju cjepivima koja nisu dovoljno imunogenična. Muramildipeptid (MDP) se pokazao dobrim imunostimulatorom nespecifične imunosti na različite vrste virusa, ali se klinički ne upotrebljava zbog svojih nuspojava, kao što su pirogenost i artritogenost. Zbog toga je priređen velik broj analoga MDP-a, od kojih su neki dospjeli do stupnja kliničkog ispitivanja infektivnih bolesti i raka [3]. Proučavanjem utjecaja strukture analoga MDP-a na aktivnost spoja uočeno je da se adjuvantska aktivnost ne umanjuje ako se na šećernom dijelu anomerna hidroksilna skupina zamijeni  $\alpha$ - ili  $\beta$ -metilnom skupinom. Također, acetamid na položaju C-2 može se zamijeniti drugom acilamido-skupinom. Nadalje, moguća je i zamjena GlcNAc s ugljikohidratnim konfiguracijskim izomerom, primjerice manoznim izomerom. Zamjenom L-Ala s glicinom ili nekom drugom L-aminokiselinom ne dolazi do gubitka adjuvantske aktivnosti, međutim ako se napravi zamjena s D-Ala, imunostimulacijska aktivnost se gubi. U glutaminskom dijelu bitan je fragment od dvije metilenske skupine koji razdvaja slobodne ili supstituirane karboksilne skupine te da je zadržana D-konfiguracija na  $\alpha$ -ugljikovom atomu. Mehanizam imunostimulacijskog djelovanja MDP-a još nije razjašnjen stoga je dizajniranje novih, aktivnijih derivata i analoga MDP-a temeljeno isključivo na rezultatima dobivenim proučavanjem utjecaja strukture na imunoaktivnost spoja. Pokazalo se da je lipofilnost jedan od najvažnijih parametara na koji treba utjecati, s ciljem da se poboljšaju farmakološka svojstva MDP-a. Povećanjem lipofilnosti

se olakšava unos MDP analoga u makrofage. Budući da su istraživanja pokazala da ugljikohidratna komponenta (MurNAc) nije ključna za imunostimulatorni učinak MDP-a, u dizajnu i sintezi lipofilnijih adjuvanata izvedenih iz MDP-a često je korišten pristup koji uključuje modifikaciju ili čak uklanjanje ugljikohidratnog dijela. Takvi analozi bez šećerne podstrukture nazivaju se desmuramildipeptidi.[4]

### 2.1.2. Manozni derivati desmuramildipeptida

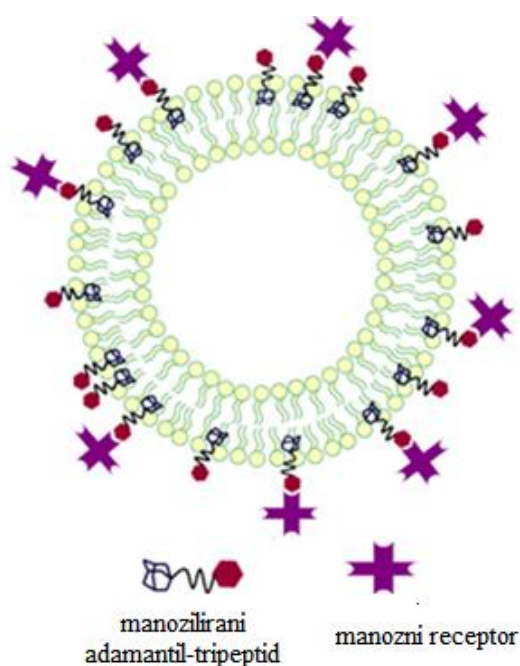
Lektini specifično vežu ugljikohidrate te sudjeluju u različitim biološkim procesima, kao što su imunološki odgovor, sinteza glikoproteina i slično. Jedan od lektina koji sudjeluje u aktivaciji imunološkog sustava i koji specifično prepoznaje manozu je manozni receptor (MR). Manozni receptori postoje u različitim oligomernim strukturama, od dimera do heksamera. Građeni su od 3 polipeptidna lanca koji su identični. Svaki od lanaca posjeduje domenu koja prepoznaje ugljikohidrate (eng. *carbohydrate-recognition domain*, CRD), hidrofobni vrat, kolagensku regiju i N-terminalnu regiju bogatu cisteinom. Kolagenske regije triju lanaca tvore klasičnu trostruku uzvojniciu. U hidrofobnom dijelu svaki lanac posjeduje isprepletenu zavojniciu, a C-kraj domene koja prepoznaje ugljikohidrate ima svojstva globularnih proteina. Svaka domena veže  $\text{Ca}^{2+}$  ion koji onda može koordinirati odgovarajuće šećere preko 3- i 4-hidroksilne skupine. Ponavljajuće šećerne skupine na površini mikroba predstavlja idealne mete za manozne receptore. [5, 6, 7]

Manoziliranje desmuramildipeptidnih adjuvanata pokazalo se vrlo važnom modifikacijom. Adamantilni derivati, (adamant-1-il)tripeptidi i (adamantil-2-il)tripeptidi koji su preko (*R*)- i (*S*)-3-hidroksi-2-metilpropionskih poveznica konjugirani s  $\alpha$ -D-manopiranozom pokazali su pojačanu adjuvantску aktivnost u odnosu na polazne tripeptide. Najjače adjuvantско djelovanje pokazao je izomer prikazan na slici 2.



Slika 2. Manozilirani (adamant-1-il)tripeptid s poveznicom *R*-konfiguracije

Manozilirani adamantil-tripeptidi mogu se upotrijebiti i za pripremu manoziliranih liposoma koji mogu poslužiti kao nosači za ciljanu dostavu aktivnih tvari, lijekova i antigena do stanica s eksprimiranim manoznim receptorima na njihovoj površini. Adamantan se pri tome ugrađuje u lipidni dvosloj, a manaza ostaje na površini liposoma (slika 3) što može dovesti do interakcije s komplementarnim proteinima, lektinima.[8] Manozni receptori (MR) prisutni su na površini različitih imunokompetentnih stanica, kao što su makrofagi i dendritičke stanice te su prepoznati kao potencijalne mete za vezanje manoziliranih antigena, relevantnih biološki aktivnih molekula koje sadrže manozu. Također mogu se koristiti za unos lijekova koji u svojoj strukturi sadrže manozu, te na taj način mogu utjecati na sami tijek reakcija u imunološkom sustavu.[6]

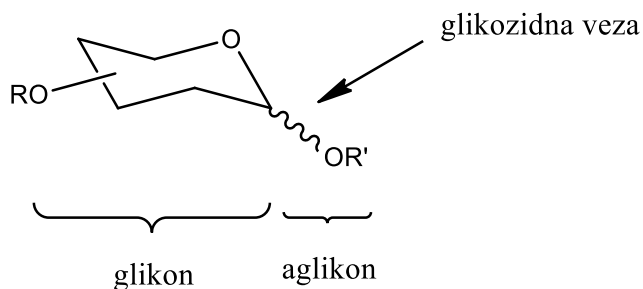


Slika 3. Shematski prikaz interakcije manoziliranog adamantil-tripeptida ugrađenog pomoću adamantila u lipidni dvosloj s manoznim receptorom

Poznati su i lipidni konjugati koji se sastoje od dvije i četiri molekule manoze vezanih različitim poveznicama na molekulu palmitinske kiseline ili distearoil-fosfatidiletanolamina. Sintetizirani amfifatski manokonjugati ugrađeni u liposome korišteni su u ispitivanju utjecaja multivalentnosti na afinitet i specifično prepoznavanje MR-a. Uočeno je da manozni receptor specifično prepoznaje liposome s ugrađenim manozil-lipokonjugatima, te da afinitet za manozil-lipokonjugate raste s porastom broja molekula manoze u molekuli lipokonjugata.[9] Stoga možemo zaključiti da ugrađivanje dimanoziliranih desmuramildipeptidnih adjuvanata (analogi prethodno sintetiziranih manoziliranih adamantil-tripeptida) u liposome može znatno utjecati na aktivnost obzirom da bi manaza djelovala na specifično usmjeravanje adjuvanta prema makrofagima, a liposomi bi olakšali intracelularnu penetraciju u makrofage.

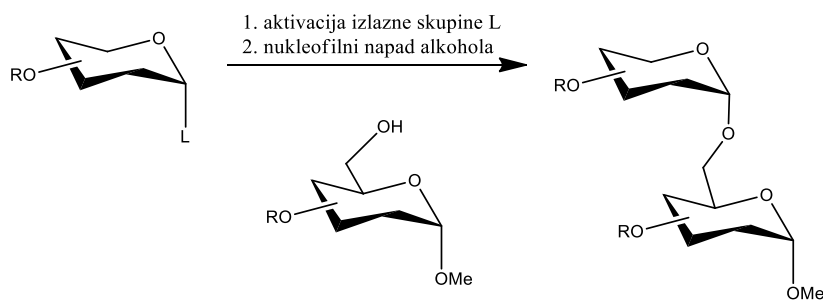
## 2.2. PRIPRAVA *O*-GLIKOZIDA

Glikozidi su acetali ili ketali cikličkih aldoza ili ketoza kod kojih je anomerna hidroksilna skupina zamijenjena drugim supstituentom. Molekula šećera (glikon) povezana je glikozidnom vezom preko anomernog ugljikovog atoma za nešećernu skupinu (aglikon) (slika 4). Ovisno o vrsti aglikonske skupine koja čini glikozid, razlikujemo *O*-glikozide, tioglikozide, glikozilamine i *C*-glikozilirane spojeve koji sadrže *O*-, *S*-, *N*-, odnosno *C*-glikozidne veze. Ovisno o konfiguraciji na anomernom ugljikovom atomu šećera također razlikujemo  $\alpha$ - i  $\beta$ -glikozidnu vezu.



Slika 4. Opća struktura *O*-glikozida

Prilikom sinteze glikozidne veze prvo se aktivira anomerna hidroksilna skupina prevođenjem glikona u glikozil-donor s dobrom izlaznom skupinom, a zatim slijedi stereoselektivan prijenos donora na glikozil-akceptor. Reakcija se obično izvodi uz prisutnost aktivatora, prisutnog najčešće u katalitičkoj količini, koji potpomaže odlasku izlazne skupine (Shema 1). Prilikom pripreve *O*-glikozida, kao glikozil-donori najčešće se koriste glikozil-halogenidi, tioglikozidi, glikozil-imidati, dok glikozilni akceptor može biti alkohol ili druga molekula ugljikohidrata koja najčešće sadrži samo jednu slobodnu hidroksilnu skupinu. [10, 11]



Shema 1. Općeniti prikaz reakcije glikozilacije

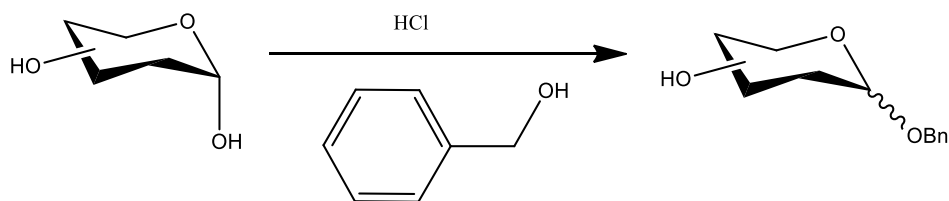
Osim dobre izlazne skupine, za reakcije glikozilacije važna je zaštita preostalih slobodnih hidroksilnih skupina šećera. Glikozidna veza stabilna je tijekom reakcije hidrogenolize, redukcije hidridima i u prisutnosti baze, a nestabilna je u kiselim uvjetima.

### 2.2.1. Zaštita hidroksilnih skupina

Ugljikohidrati sadrže velik broj hidroksilnih skupina i te se funkcijske skupine moraju razlikovati u reakcijama kako bi se postigla kemoselektivnost i regioselektivnost reakcija. Na stvaranje stereoselektivne glikozidne veze utječu izlazne skupine, aktivatori, otapala koja se koriste u reakciji, ali i zaštitne skupine na glikozil-donoru, odnosno na glikozil-akceptoru, od kojih se najčešće koriste glikozidne, eterske, esterske i acetalne zaštite.[10, 12]

#### 2.2.1.1. Glikozidna zaštita

Glikozidna zaštita se koristi za zaštitu anomerne hidroksilne skupine. Za uvođenje ove vrste zaštite koristi se postupak Fischerove sinteze glikozida. Reakcijom monosaharida s alkoholima u prisutnosti kiselog katalizatora nastaju glikozidi. Najčešće korišteni reagensi za ovu vrstu zaštite su benzilni i alilni alkohol. Za uklanjanje benzilne zaštite koristi se postupak katalitičke hidrogenolize uz paladij na ugljiku kao katalizator. Alilna zaštita se skida pomoću paladija na ugljiku u prisutnosti *p*-TsOH uz refluks. Prilikom reakcije glikozidacije nastaje smjesa stereoizomernih glikozida koji su u ravnoteži (shema 2).

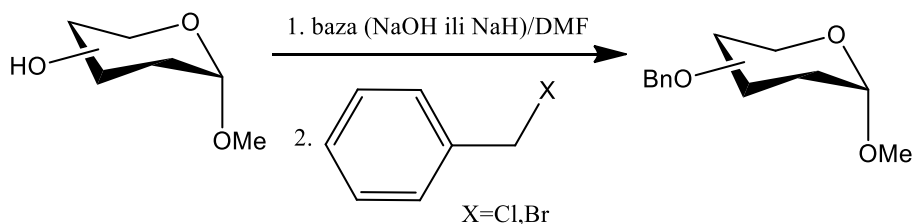


Shema 2. Selektivno uvođenje benzilne zaštitne skupine

#### 2.2.1.2. Eterska zaštita

Eterska zaštita hidroksilnih skupina jedna je od najčešće korištenih zaštitnih skupina u organskoj sintezi. Eterska zaštita sterički blokira pristup elektrofila kisikovu atomu hidroksilne skupine i time mu smanjuje nukleofilnost. Osim toga blokira hidroksilnu skupinu da reagira s jakom bazom zamjenom vodikova atoma s alkilnom skupinom. Zaštita može biti u obliku sililnog etera, alkilnog etera, alilnog etera, alkoksimetilnog etera, tetrahidropiranih etera i metiltiometilnog etera. Alkilni eteri se u kemiji glikozida koriste kao privremene zaštitne skupine jer su vrlo stabilni i otporni na djelovanje kiselina i baza. Najčešće korištena eterska zaštitna skupina je benzilna zaštita koja se uvodi postupkom Williamsonove sinteze etera tj. alkiliranjem alkoksida metala s benzil-kloridom ili benzil-bromidom u prisutnosti baze u polarnom aprotionskom otapalu, npr. DMF (shema 3). Benzilni eteri su stabilni i u baznim i u kiselim uvjetima te ne podliježu reakcijama oksidacije i redukcije. Najčešći i najlakši način uklanjanja benzilne zaštite je katalitička hidrogenoliza uz paladij na ugljiku kao katalizator.[13,14]

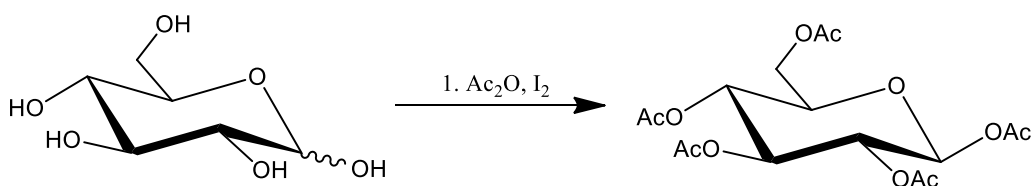




Shema 3. Uvođenje benzilne zaštitne skupine

#### 2.2.1.3. Esterska zaštita

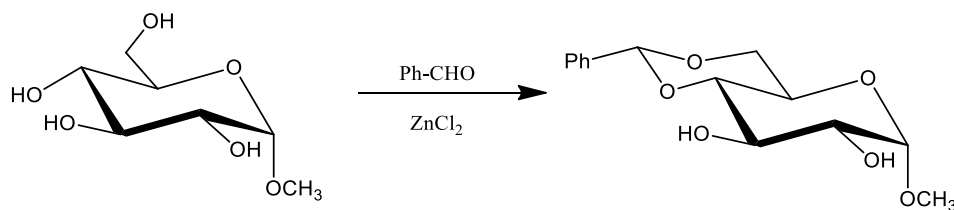
Esterska zaštita blokira hidroksilnu skupinu da ne reagira s oksidansima, elektrofilima i bazama tako što delokalizira elektronski par s kisikovog atoma hidroksilne skupine. Esteri su vrlo stabilne zaštitne skupine i pružaju učinkovitu zaštitu u reakcijama sinteze peptida i glikozilacije. Hidroksilna skupina se može prevesti u estere organskih kiselina, karbonate, miješane estere i sulfonate. Najčešće korištena esterska zaštitna skupina je acetatna. Acetatna zaštita se uvodi reakcijom s acetanhidridom uz dodatak joda kao katalizatora (shema 4). Uklanja se u blago bazičnim uvjetima, a može se ukloniti i kiselo kataliziranim solvolizom uz prisutnost vode ili alkohola. Problem s ovom zaštitnom skupinom je taj da ima tendenciju k intramolekularnoj transesterifikaciji, što može dovesti do migracije acetata na susjednu hidroksilnu skupinu.[13, 14]



Shema 4. Uvođenje acetatne zaštitne skupine

#### 2.2.1.4. Acetalna zaštita

Ciklički acetali koriste se za istovremenu zaštitu dviju hidroksilnih skupina prisutnih u ugljikohidratnom prstenu. Ciklički acetali se uvode kiselo kataliziranim reakcijama s aldehidima ili ketonima, a uklanjaju u kiselim uvjetima. U kemiji ugljikohidrata najviše se koristi benzilidenska zaštita, kao 4,6-*O*-zaštita kod heksapiranozida (shema 5). Kod šestoročlanih prstenova prilikom uvođenja benzilidenske zaštite nastaje termodinamički povoljniji produkt s fenilnim supstituentom u ekvatorijalnom položaju.[14] Zaštitne skupine kod ugljikohidrata mogu utjecati na reaktivnost i na stereokemijski ishod glikozilacijske reakcije.[15]



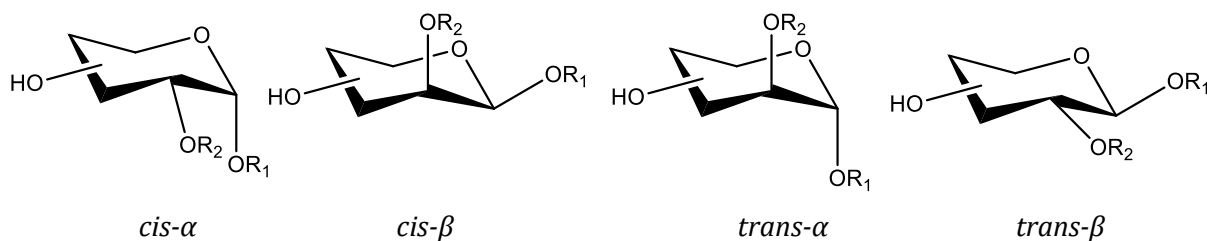
Shema 5. Uvođenje benzilidenske zaštitne skupine

#### 2.2.1.5. Selektivna deacetilacija anomernog ugljikova atoma

Selektivno anomerno deacetiliranje često je ključni korak u sintezi oligosaharida. Poznato je više različitih metoda od kojih neke uključuju žestoke uvjete te skupe i toksične reagense. Često se korišteni reagensi dodaju u stehiometrijskoj količini ili u suvišku. Cinkov acetat dihidrat blaga je Lewisova kiselina. Jeftin je i koristi se u blagim reakcijskim uvjetima za regioselektivno deacetiliranje peracetiliranih šećera. Djelovanjem cinkovog acetata dihidrata na pentaacetiliranu manozu, ramnozu i celobiozu dolazi do regioselektivnog deacetiliranja na anomernom ugljikovu atomu i pri tome nastaje samo  $\alpha$ -anomer.[16]

#### 2.2.2. Stereokemija sinteze glikozida

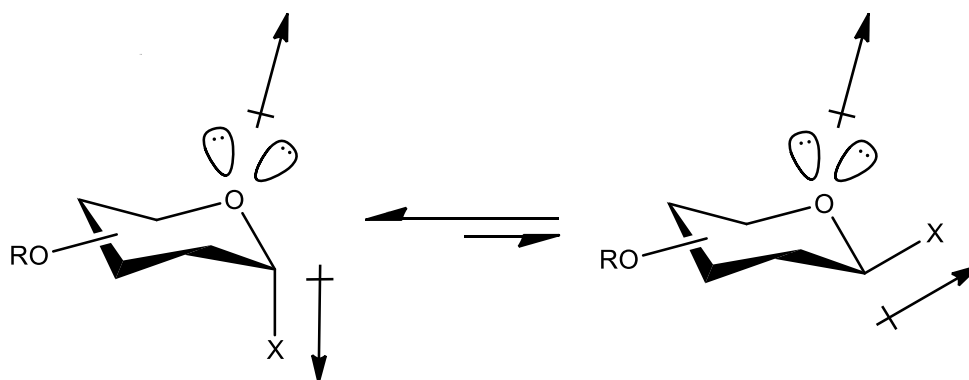
Glikozilacijske reakcije jedne su od složenijih reakcija kod sinteze prirodnih spojeva i najčešće nastaje smjesa izomera, što u konačnici rezultira niskim iskorištenjima reakcija. U određenim uvjetima glikozidacijske reakcije mogu biti stereoselektivne, odnosno, može doći do nastajanja samo jednog anomera. Stereokemijski gledano, četiri su glavna tipa glikozida, 1,2-*cis*  $\alpha$ - i  $\beta$ - te 1,2-*trans*  $\alpha$ - i  $\beta$ - glikozidi (slika 5). Manopiranozidi mogu postojati u dvije konfiguracije; 1,2-*cis*, odnosno  $\beta$ - te 1,2-*trans*, odnosno  $\alpha$ -konfiguraciji. Veliki utjecaj na stereoselektivnost glikozidacije imaju strukture glikozil-donora i glikozil-akceptora, ali i izbor aktivatora i otapala za reakciju. Na stereoselektivnost također mogu utjecati temperatura, tlak, koncentracija ili redoslijed dodavanja reaktanata u reakcijsku smjesu.[10]



Slika 5. Položaj glikozidne veze u glikopiranozidima

Ekvatorijalni položaj supstituenata kod ugljikohidrata najčešće proizlazi iz steričkih razloga. Međutim, skupine vezane preko anomernog centra ne slijede uvijek to pravilo. Ako derivati ugljikohidrata imaju

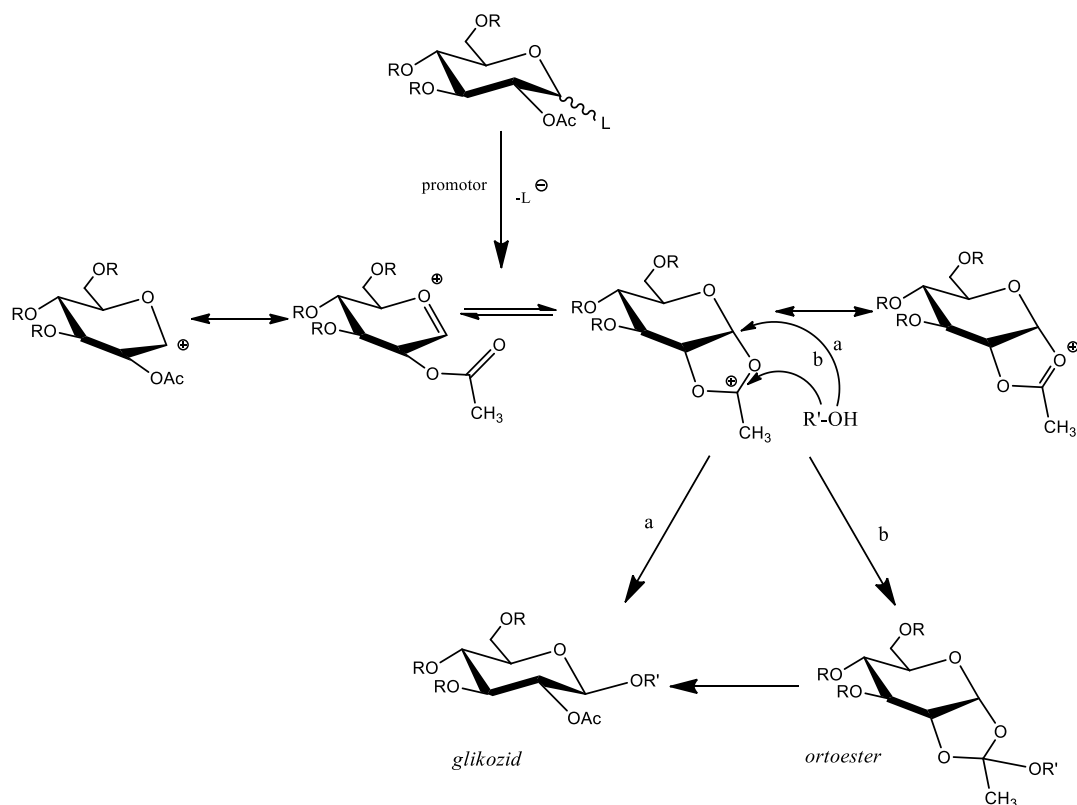
elektronegativne skupine na anomernom ugljikovom atomu,  $\alpha$ -konfiguracija na anomernom centru je stabilnija, bez obzira na steričke interakcije sa susjednim skupinama. Anomerni efekt uključuje intramolekulske elektrostatske interakcije dva dipola kod anomernog centra, od kojih jedan dolazi od dva nesparena elektronska para na kisikovom atomu ugljikohidratnog prstena. Drugi dipol potječe od polarizirane veze anomernog ugljikovog atoma s vezanim atomom (slika 6). Položaj supstituenata na anomernom atomu u slučaju kada se dva dipola međusobno poništavaju povoljniji je od konfiguracije anomernog centra koja dovodi do njihovog zbrajanja.[14]



Slika 6. Anomerni efekt

#### 2.2.2.1. 1,2-*trans* glikozidacija

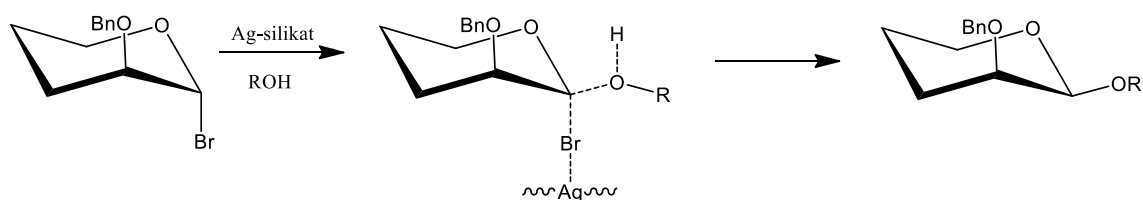
Stereoselektivna sinteza 1,2-*trans*-glikozida posljedica je participacije susjedne skupine na C-2 atomu šećera. Kao što to prikazuje shema 6, aktivatorom posredovan izlazak izlazne skupine u reakciji glikozilacije dovodi do formiranja oksokarbenijevog iona, a prisutnost acetilne skupine na susjednom C-2 atomu šećera pogoduje formiranju acetiloksonijevog iona. Nukleofilni napad alkohola u tom slučaju dovodi do formiranja ortoestera koji u konačnici izomerizira u odgovarajući glikozid. Formiranju ortoestera pogoduju neutralni i bazični uvjeti, a korištenje benzoata ili pivalata kao zaštitnih skupina na C-2 atomu smanjuje mogućnost nastajanja ortoestera. Na brzinu i stereokemiju reakcije znatno utječe 2-*O* položaj glikozil-donora. U slučaju aksijalne orijentacije 2-*O*-acetilne skupine, kao što je to kod manoze, stvaranju acetiloksonijevog iona pogoduje reverzni anomerni efekt te je tijekom reakcija manozilacije dominantna reakcija formiranje ortoestera. Stoga će 2-*O*-acetilmanozni derivat kao produkt glikozidacije dati isključivo  $\alpha$ -manopiranozid.[14]



Shema 6. 1,2-*trans* glikozidacija uz participaciju susjedne skupine (prilagođeno iz [14])

#### 2.2.2.2. 1,2-*cis* glikozidacija

Kemijskom sintezom 1,2-*cis* glikozidaciju puno je teže postići od 1,2-*trans* glikozidacije. To se obično postiže *in situ* anomerizacijom  $\alpha$ -piranozil-halogenida, koji na C-2 položaju ima neparticipirajuću skupinu, u prisutnosti tetraalkilamonijevog bromida.  $\beta$ -piranozil-halogenid ima veću reaktivnost od njegovog  $\alpha$ -analoga što dovodi do formiranja kinetički kontroliranog 1,2-*cis* produkta. Ovakav pristup dobar je za pripravu  $\alpha$ -glukopiranozida i  $\alpha$ -galaktopiranozida, ali je nepovoljan za pripravu  $\beta$ -manopiranozida. Kod manoznih šećera, zbog anomernog i steričkog efekta, dolazi do nastajanja  $\alpha$ -anomera s visokom selektivnošću.[17]  $\beta$ -manopiranozid je moguće pripremiti uvođenjem srebrovih soli u reakciju glikozidacije  $\alpha$ -manopiranozil-bromida. Srebrove soli su u interakciji s atomom broma i posreduju u inverziji konfiguracije na anomernom ugljikovu atomu (shema 7).[14]



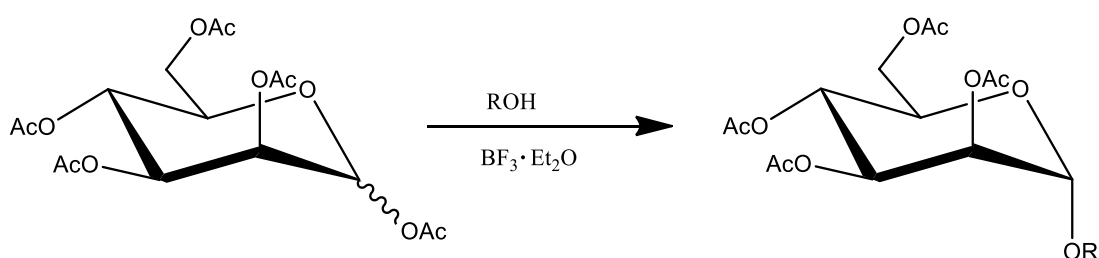
Shema 7. Metoda priprave  $\beta$ -manopiranozida iz  $\alpha$ -manopiranozil-bromida

### 2.2.3. Metode priprave *O*-glikozida

Razvijeno je mnoštvo različitih postupaka i metoda kemijske sinteze glikozida. Tri glavne metode detaljnije su opisane u nastavku, a sažeti prikaz ostalih metoda nalazi se u tablici 1.

#### 2.2.3.1. Direktna metoda

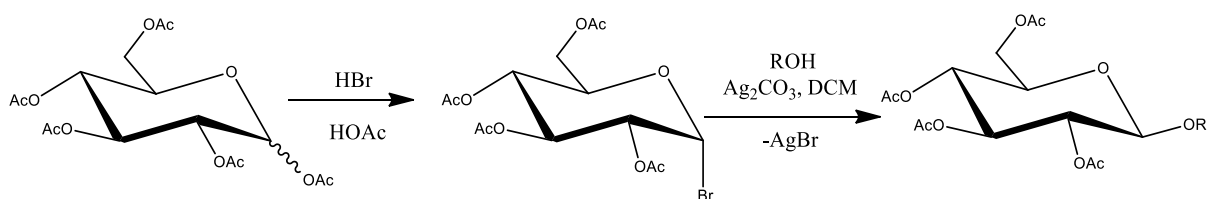
Direktna metoda glikozidacije koristi se pri sintezi jednostavih glikozida koristeći peracetilirane šećere kao glikozil-donore uz dodatak Lewisove kiseline koja je aktivator reakcije. Zbog participacije susjedne skupine nastaju isključivo 1,2-*trans* glikozidi poput  $\alpha$ -manopiranozida (shema 8),  $\beta$ -galaktopiranozida i  $\beta$ -glikopiranozida.



Shema 8. Direktna metoda glikozidacije

#### 2.2.3.2. Koenigs-Knorr metoda

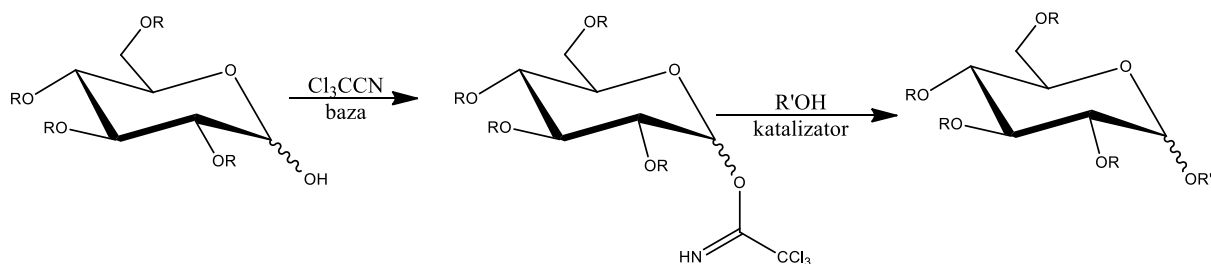
Jedna od najstarijih i danas često korištenih metoda priprave raznovrsnih *O*-glikozida je Koenigs-Knorr metoda. Kao glikozidni donori najčešće se koriste glikozil-bromidi i kloridi koji se priređuju *in situ* reakcijom peracetiliranog šećera i HBr u octenoj kiselini tj. kositrovog(IV) klorida. Srebrove soli se koriste kao aktivatori, ali služe i za neutralizaciju kiseline koja nastaje u reakciji. Često se u reakciju dodaju i sredstva za sušenje, kao što su molekulska sita i kalcijev sulfat. Prinos reakcije može se povećati dodatkom joda, snažnim miješanjem reakcijske smjese te zaštitom od svjetla.[12] Koenigs-Knorr glikozilacijom pretežno nastaju 1,2-*trans* glikozidi (shema 9). Glavni nedostaci navedene metode su korištenje soli teških metala, soli žive(II) kao aktivatora i to u ekvimolarnim količinama, te nestabilnost  $\beta$ -glikozil-bromida kao posljedica anomernog efekta. S druge strane, velika prednost metode je laka dostupnost glikozil-donora.[14]



Shema 9. Koenigs-Knorr metoda glikozilacije

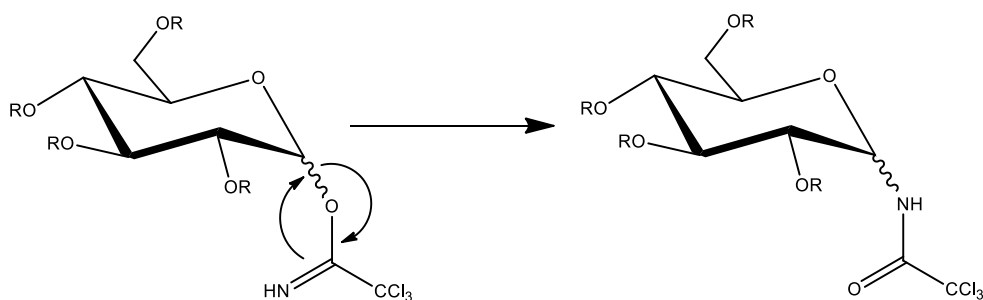
### 2.2.2.3. Trikloracetimidna metoda

Začetnik trikloracetimidne metode je R. R. Schmidt sa suradnicima koji su prvi priredili *O*-glikozil-trikloracetimide koji se koriste kao glikozil-donori s vrlo dobrom izlaznom skupinom. Metoda se temelji na upotrebi trikloracetonitrila koji u bazičnim uvjetima reagira s kisikom iz anomerne hidroksilne skupine šećera i daje odgovarajući imidat (shema 10). Ako se u reakciji koriste slabe baze ( $K_2CO_3$ ) nastat će kinetički stabilniji produkt,  $\beta$ -imidat. Ako se pak koriste jake baze (DBU, NaH) tijekom reakcije nastat će termodinamički stabilniji produkti,  $\alpha$ -trikloracetimidati.



Shema 10. Trikloracetimidatna metoda glikozilacije

Jedni od najčešće korištenih glikozil-donora upravo su glikozil-trikloracetimidati. Stabilniji su od odgovarajućih glikozil-bromida te se mogu čuvati i do nekoliko mjeseci na niskoj temperaturi, ali se zbog njihove osjetljivosti na zrak vrlo često odmah nakon pripreve koriste u daljnjoj reakciji glikozilacije. Sama glikozilacija katalizirana je Lewisovim kiselinama kao što su borov trifluorid eterat ( $BF_3 \cdot Et_2O$ ) koji preferentno daje *trans*-glikozide i trimetilsilil-trifluormetansulfonat (TMSOTf) koji preferentno daje *cis*-glikozide. Zbog prisutnosti Lewisove kiseline može doći i do neželjene reakcije Chapmanove pregradnje trikloracetimidata (shema 11).[12,14]



Shema 11. Chapmanova pregradnja trikloracetimidata

Osim opisanih metoda stereoselektivnih *O*-glikozidacija, *O*-glikozide moguće je pripremiti i klasičnim supstitucijskim reakcijama. Ukoliko se na aglikonskom dijelu nalazi dobra izlazna skupina i ukoliko reakcijski uvjeti pogoduju  $S_N2$  tipu reakcije, anomerna hidroksilna skupina može djelovati kao nukleofil koji supstituira izlaznu skupinu s aglikona te se na taj način ostvaruje *O*-glikozidna veza. Upravo ova metoda *O*-glikozidacije, zapravo nekarakteristična metoda u glikokemiji, korištena je u ovom radu.

Naime, kod prethodno opisanih metoda glikolizacije izlazna skupina nalazi se na šećeru (glikozil-donoru), dok je ovdje ona na glikozil-akceptoru (aglikonskom dijelu).

Tablica 1. Pregled ostalih metoda pripreve *O*-glikozida [12, 14]

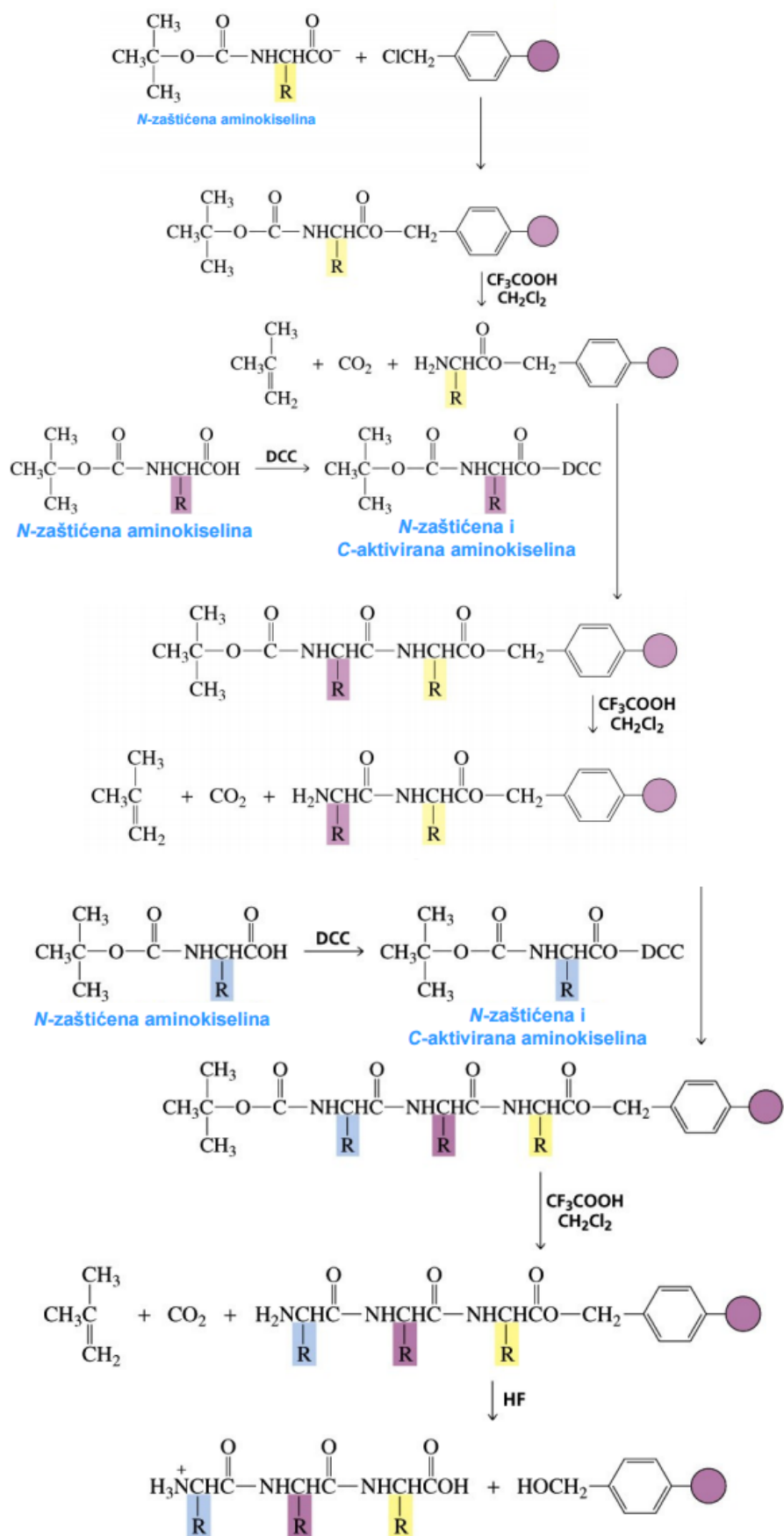
Metoda	Izlazna skupina (L)	Aktivator	Komentar
<b>Helferichova metoda</b>	Br, Cl	Hg(CN) <sub>2</sub> , HgBr <sub>2</sub> ili HgI <sub>2</sub>	Modifikacija Koenigs-Knorr metode. Prinos reakcije iznad 70 %, ali često nastaje smjesa anomera.
<b>Michaelova metoda</b>	Br, Cl	NaH K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , NaOH	Koristi 2,3,4,6-tetraacetilglikozil-halogenid kao donor. Nastaje isključivo $\beta$ - <i>O</i> -glikozid kao produkt.
<b>Fischerova metoda</b>	OH	HCl(g) ili <i>p</i> -TsOH	Koristi nezaštićeni donor. Dobra za glikozidaciju malih alifatskih alkohola. Reakcija nije stereoselektivna.
<b>Tioglikozidacija</b>	SCH <sub>3</sub> , SCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NIS-TfOH NBS TMSOTf	Pogodna za pripravu složenih šećera. Stabilni glikozidi, mogu biti i glikozil-akceptori.
<b>n-pentenil-glikozidacija</b>	O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH=CH <sub>2</sub>	NIS-TfOH, NIS-TMSOTf, NIS-Sn(OTf) <sub>2</sub> ili NIS-BF <sub>3</sub> · Et <sub>2</sub> O	Pogodna za pripravu složenih šećera. Stabilni glikozidi, mogu biti i glikozil-akceptori.

### 2.3. SINTEZA PEPTIDA

Prvi peptid u otopini sintetizirao je Emil Fischer 1901. godine i upravo se ta sinteza smatra početkom razvitka peptidne kemije. Sintetski peptidi danas nalaze primjenu u mnogim granama znanosti poput farmakologije, molekularne biologije, enzimologije i imunologije. Kako je većinu moguće izolirati tek u vrlo malim količinama, neophodno je u proučavanju njihove funkcije pribjeći kemijskoj sintezi peptida. Danas postoje dva glavna pristupa u sintezi peptida: sinteza u otopini i sinteza na krutom nosaču. Standardna sinteza peptida u otopini zasniva se na kondenzaciji dviju aminokiselina. Jedna aminokiselina je zaštićena na *N*-kraju, a druga na *C*-kraju. Aktivacija slobodne karboksilne skupine zatim dovodi do stvaranja amidne veze između dviju aminokiselina, a selektivno uklanjanje zaštitnih skupina do željenog dipeptida. Sinteza dužih peptidnih lanaca radi se kondenzacijom fragmenta. Iako je metoda vrlo jeftina, ona je zahtjevna i dugotrajna jer je svaki međuprodukt prije sljedeće reakcije kondenzacije potrebno izolirati, pročistiti i okarakterizirati. Još jedna ograničavajuća stvar pri sintezi velikih oligopeptida je ta da povećanjem aminokiselinskog slijeda u peptidu opada njegova topljivost u organskim otapalima. Zbog toga se ova metoda koristi za sintezu manjih oligopeptida i uvelike je zamjenjuje sinteza na krutom nosaču što je dovelo do velikog napretka.

Američki biokemičar Robert B. Merrifield je 1959. godine uveo metodu sinteze peptida na krutom nosaču. Princip metode prikazan je na shemi 12. Metoda se sastoji od spajanja aminokiseline preko *C*-kraja na netopljivi inertni nosač (zrnca polistirena) i kondenzacije s drugom aminokiselinom koja ima aktiviranu karboksilnu skupinu i zaštićenu amino-skupinu. Nakon ispiranja neizreagiranog reaktanta, uklanja se zaštitna skupina s *N*-kraja novonastalog dipeptida, koji će u sljedećem ciklusu stvoriti peptidnu veza sa sljedećom aminokiselinom. Nakon završetka sinteze željenog peptida u posljednjem ciklusu uklanja se zaštitna skupina s *N*-kraja i sam peptid s krutog nosača pomoću fluorovodične kiseline. Ova metoda je danas automatizirana, ali je ograničena na duljinu lanca od 50 aminokiselinskih sekvenci i svaku novu aminokiselinu mora se dodavati u velikom suvišku da bi se dobio visok prinos. I dalje je velika prednost metode to što je moguće nakon svake reakcije kondenzacije isprati neizreagirani reaktant, međuprodukte i soli dok rastući peptid ostaje kovalentno vezan na kruti nosač.[18]



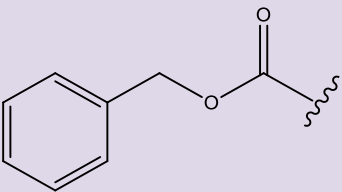
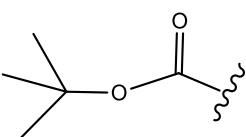
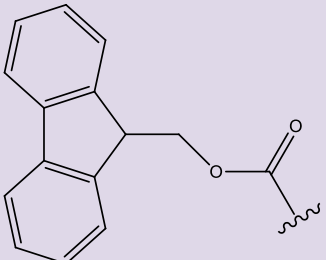


Shema 12. Primjer sinteze tripeptida na krutom nosaču

### 2.3.1. Zaštitne skupine u sintezi peptida

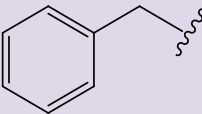
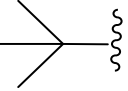
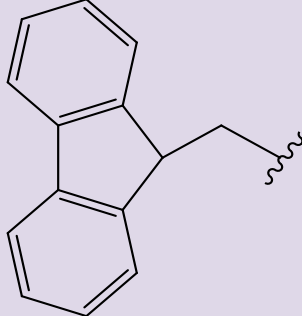
Kao što možemo vidjeti na shemi 11, zaštitne skupine su neophodne da bi sinteza peptida bila selektivna. Aminokiseline sadrže dvije vrlo reaktivne funkcijske skupine, amino-skupine i karboksilnu skupinu. Određene aminokiseline sadrže i reaktivne skupine na bočnim lancima što može dovesti do neželjenih međuprodukata i nusprodukata kao što su razgranati peptidi. Emil Fischer prvi je prepoznao važnost korištenja privremenih zaštitnih skupina kako bi se postigla regioselektivnost prilikom stvaranja veza u sintezi ugljikohidrata i peptida. Općenito, zaštitne skupine mogu se podijeliti u tri skupine ovisno o tome zaštićuje li se njima *N*-kraj, *C*-kraj ili bočni ogranak. Zaštitna skupina mora zadovoljavati određene kriterije, među kojima su: lako uvođenje u molekulu, stabilnost u reakcijskim uvjetima te lako uklanjanje, bilo usred ili na kraju sintetskog postupka. Prvu zaštitnu skupinu koja se i danas koristi u sintetskoj organskoj kemiji, benziloksikarbonilnu skupinu (Cbz ili Z), razvili su Bergmann i Zervas. Cbz je karbamatna zaštitna skupina za  $\alpha$ -amino-skupinu. Karbamatna zaštita blokira  $\text{NH}_2$ -skupinu da ne reagira s kiselinama i elektrofilima jer dolazi do konjugacije s  $\pi$ -sustavom. Osim Cbz-a još se koriste i *tert*-butiloksikarbonilna (Boc), 9-fluorenilmetoksikarbonilna (Fmoc) zaštita (tablica 2).

Tablica 2. Pregled najčešće korištenih zaštitnih skupina za  $\alpha$ -amino-skupinu

Zaštitna skupina	Način uvođenja	Način uklanjanja	Mjesto zaštite
 <b>benziloksikarbonil- (Cbz, Z)</b>	Cbz-Cl, $\text{NaHCO}_3$ , dioksan, $\text{H}_2\text{O}$	$\text{Pd-C} / \text{H}_2$ $\text{HBr} / \text{HOAc}$ $\text{BBr}_3$	$\alpha$ -amino-skupina
 <b>tert-butiloksikarbonil- (Boc)</b>	$\text{Boc}_2\text{O}$ , $\text{NaHCO}_3$ , dioksan, $\text{H}_2\text{O}$	25 – 50 % TFA / DCM HCl / dioksan	$\alpha$ -amino-skupina
 <b>9-fluorenilmetoksikarbonil- (Fmoc)</b>	Fmoc-Cl, $\text{NaHCO}_3$ , dioksan, $\text{H}_2\text{O}$	<u>Čvrsti nosač:</u> 20 % piperidin / DMF 1 – 5 % DBU / DMF Morfolin / DMF (1 : 1) <u>Otopina:</u> $\text{NH}_3(l)$ / morfolin 10 % dietilamin	$\alpha$ -amino-skupina

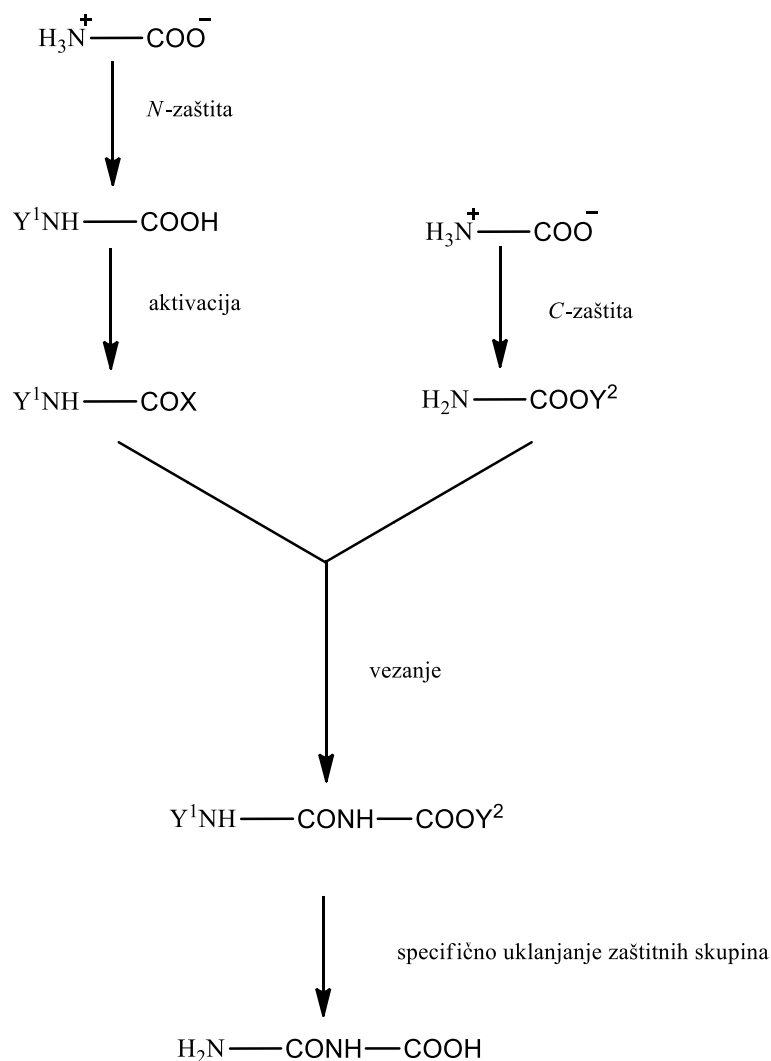
Zaštita karboksilne skupine najčešće se provodi pripravom stabilnih estera koji ne hidroliziraju u uvjetima stvaranja peptidne veze. Takvi su primjerice metilni esteri i njihovi derivati, alkoksialkilni esteri, esteri koji se cijepaju  $\beta$ -eliminacijom te sililni esteri. Najčešće korišteni su benzilni (Bn), *tert*-butilni (*t*-Bu) te 9-fluorenilmetilni (Fm) esteri. Zaštićivanjem se želi spriječiti nukleofilna adicija na karbonilnoj skupini ili ukloniti kiseli proton kako ne bi sudjelovao u bazno-kataliziranoj reakciji (tablica 3).

Tablica 3. Pregled najčešće korištenih zaštitnih skupina za  $\alpha$ -karboksilnu skupinu

Zaštitna skupina	Način uvođenja	Način uklanjanja	Mjesto zaštite
 <b>benzil- (Bn)</b>	<i>O</i> -benzil- <i>N,N'</i> - diizopropilizourea THF	Pd-C / H <sub>2</sub> HF	$\alpha$ -karboksilna skupina
 <b><i>tert</i>-butil- (<i>t</i>-Bu)</b>	<i>t</i> -BuOH, EDC · HCl, DMAP, DCM	90 % TFA / DCM (čvrsti nosač i otopina) 4 M HCl / dioksan (otopina)	$\alpha$ -karboksilna skupina
 <b>9-fluorenilmetil- (Fm)</b>	FmOH, EDC · HCl, DMAP, DCM	20 % piperidin / DMF Pd-C / H <sub>2</sub> (otopina)	$\alpha$ -karboksilna skupina
<b>metiloksikarbonil- (COOMe), etiloksikarbonil- (COOEt)</b>	ClCO <sub>2</sub> Me / K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ClCO <sub>2</sub> Et / K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	LiOH NaOH KOH	$\alpha$ -karboksilna skupina

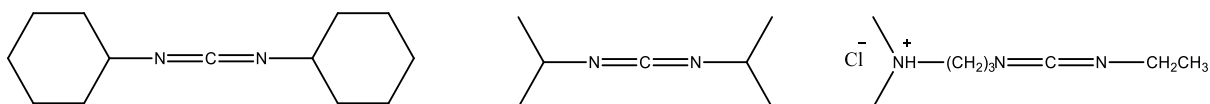
### 2.3.2. Reakcija kondenzacije aminokiselina

Peptidna veza nastaje nukleofilnim napadom amino-skupine jedne aminokiseline na aktiviranu karboksilnu skupinu druge aminokiseline (shema 13). Aktivacija karboksilne skupine ključni je korak u sintezi peptida, a njena svrha je povećanje elektrofilnosti karbonilnog ugljikovog atoma te prevođenje hidroksilne skupine u bolju izlaznu skupinu. Danas su najčešće korištene dvije metode kojima se postiže kondenzacija aminokiselina. Jedna aktivira karboksilnu skupinu *in situ*, dok se drugom metodom priredi i izolira aktivirani ester aminokiseline.



Shema 13. Reakcija kondenzacije aminokiselina

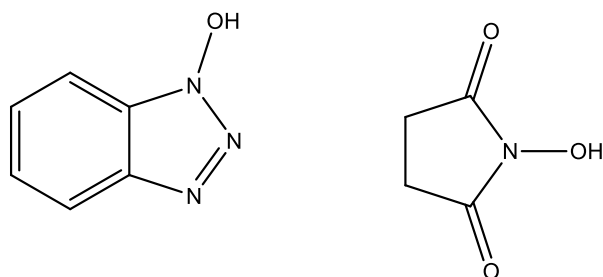
Za aktivaciju  $\alpha$ -karboksilne skupine najčešće se koriste karbodiimidni aktivatori, kao što su *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC), *N,N'*-diizopropilkarbodiimid (DIC) i 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC  $\cdot$  HCl) (slika 7).



Slika 7. Najčešće korišteni karbodiimidni aktivatori  $\alpha$ -karboksilne skupine

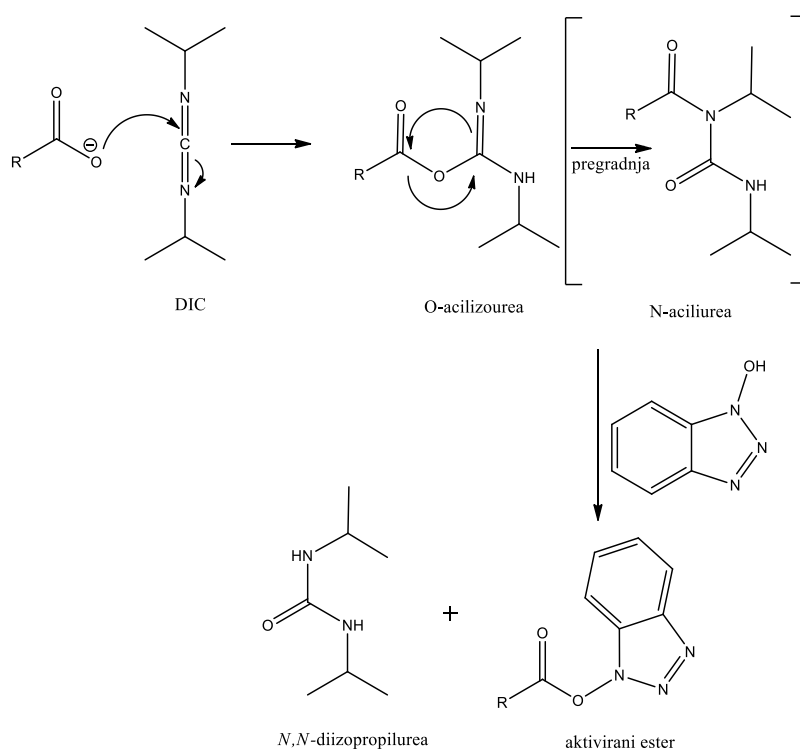
Jedan od prvih karbodiimida koji je svoju upotrebu našao u sintezi peptida na krutom nosaču bio je DDC. Također se koristi i u sintezi peptida u otopini, a uz njega se dodaju i aditivi, 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) ili *N*-hidroksisukcinimid (HOSu) (slika 8). Unatoč vrlo pristupačnoj cijeni i visokim iskorištenjima DCC je danas uvelike zamijenjen aktivatorima poput DIC i EDC. Razlog tome je glavni nusprodukt u reakcijama s DCC-om, *N,N'*-dicikloheksilurea, koji je netopljiv u vodi te ga je

vrlo teško u potpunosti ukloniti iz reakcijske smjese. Također se pokazalo da je DCC potencijalni alergen. Nusprodukti reakcija s DIC i EDC-om topljivi su u vodi i vrlo se lako uklanjaju ekstrakcijom. U novije vrijeme karbodiimidni reagensi sve se više zamjenjuju aminijevim/uronijevim solima i fosfonijevim solima koje već u strukturi sadrže aditive.



Slika 8. Strukture aditiva (HOBt i HOSu)

Shema 14 prikazuje mehanizam djelovanja karbodiimidnih reagenasa. Nukleofilnim napadom karboksilne skupine na karbodiimidni ugljikov atom dolazi do nastajanja vrlo reaktivnog međuprodukta, *O*-acilizouree. Aditivi (HOBt, HOSu) dodaju se kao pomoćni reagensi koji reagiraju s *O*-acilizouream dajući stabilniji intermedijer, te rješavaju nastanak *N*-aciluree, stabilnog nusprodukta koji lako nastaje intramolekularnom pregradnjom. Također smanjuju mogućnost racemizacije aminokiseline.[20, 21]



Shema 14. Aktivacija  $\alpha$ -karboksilne skupine uz DIC kao karbodiimidni reagens i HOBt kao aktivator (preuzeto i prilagođeno iz [21])

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI I METODE

Svi reagensi i kemikalije korišteni u sintezi bili su analitičke čistoće. Otapala korištena u radu pročišćena su prema standardnim literaturnim postupcima.[22] Za sušenje metanola prvo se pomiješaju strugotine magnezija (5 g) zrnice joda i suhi metanol (50 mL). Smjesa se zagrijava na grijaćoj kapi uz refluksiranje 4-5 h te se na formirani talog doda metanol (1 L) i dobivena smjesa se refluksira još dodatnih sat vremena. Nakon što se smjesa ohladi suhi metanol se destilira u bocu u kojoj se nalaze molekulska sita. Temperatura vrelišta apsolutnog metanola iznosila je 65 °C.

Tehnički dioksan (1 L) ulije se u tikvicu od 2 L, doda se koncentrirana klorovodična kiselina (14 mL), voda (100 mL) te kamenčići za vrenje. Otopina se grije na grijaćoj kapi uz refluksiranje 6-12 h (na hladilo se stavi klor-kalcijeva cjevčica). U hladnu otopinu dodaju se listići kalijevog hidroksida uz miješanje dok se listići prestanu topiti. Nakon toga dioksan se oddekanira i ostavi sušiti na novim listićima kalijevog hidroksida 24 h. U sljedećem koraku dioksan se refluksira 6-12 h na natriju. Čisti dioksan se destilirani u tamnu bocu i čuva na listićima natrija. Temperatura vrelišta dioksana iznosila je 100-102 °C.

Tijek reakcija, sastav frakcija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva ispitivani su tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela 60 F<sub>254</sub> (Merck). Detekcija je provedena ultraljubičastim zračenjem, reverzibilnom adicijom joda, prskanjem 10 %-tnom sumpornom kiselinom uz zagrijavanje, te ninhidrinom uz zagrijavanje. Za kromatografiju na stupcu korišten je silikagel veličine zrna 0,063-0,200 mm (Fluka).

Identifikacija i kontrola čistoće sintetiziranih spojeva provedena je TLC-om, određivanjem temperature taljenja, te pomoću infracrvene spektroskopije (IR), nuklearne magnetske rezonancije (NMR) i tekućinske kromatografije visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC-MS).

<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektri snimljeni su na spektrometru Bruker AV600 (600 MHz za <sup>1</sup>H, 150 MHz za <sup>13</sup>C). Kemijski pomaci (δ) izraženi su prema tetrametilsilanu (TMS, [(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si]) kao unutarnjem standardu.

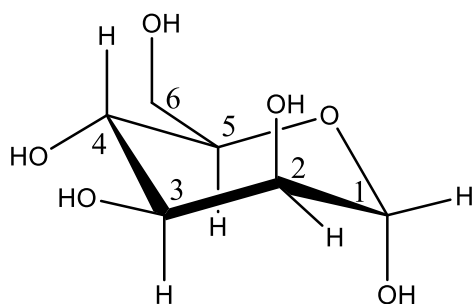
Za spektrometriju masa korišten je MS 6410 Triple Quadrupole LC/MS Agilent Technologies instrument, uz elektroraspršenje kao način ionizacije.

Temperature taljenja određene su uređajem Büchi Melting Point B-540 u otvorenim kapilarama.

Infracrveni spektar snimljen je na FT-IR spektrometru PerkinElmer Spectrum Two. Uzorak je pripremljen tehnikom KBr pastile.

Optičko skretanje izmjereno je u polarimetru Schmidt + Haensch Polartronic NH8 pri sobnoj temperaturi.

Prilikom asignacije spektara korištena je konvencionalna numeracija vodikovih i ugljikovih atoma manoze, prema IUPAC-ovim smjernicama (slika 9).



Slika 9. Asignacija ugljikovih i vodikovih atoma u manozu

### 3.2. ACETILIRANJE $\alpha$ -D-(+)-MANOPIRANOZE

#### 3.2.1. 1,2,3,4,6-Penta-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza (**1**)

U okruglu tikvicu doda se  $\alpha$ -D-(+)-manozu (1,0068 g, 2,579 mmol), acetanhidrid (7 mL) te jod (0,0607 g). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica i reakcijska se smjesa miješa pomoću magnetske mješalice na sobnoj temperaturi 1,5 h. Reakcijska smjesa je smeđe boje i uočavaju se pare joda. Nakon završetka reakcije, reakcijska smjesa se razrijedi s diklormetanom (50 mL) i prebaci u lijevak za odjeljivanje u kojem se nalazi otopina natrijeva tiosulfata (2,5 mol dm<sup>-3</sup>, 50 mL) i usitnjeni led. Nakon ekstrakcije organski sloj se obezboji. Slojevi se odvoje, a organski sloj se ekstrahira još dva puta zasićenom otopinom natrijevog karbonata (50 mL). Odvoje se slojevi te se organski sloj ispere zasićenom otopinom natrijevog hidrogenkarbonata (50 mL). Nakon što se slojevi ponovo odvoje organski sloj se suši na bezvodnom magnezijevu sulfatu. Otopina se profiltrira i otapalo se upari. Dobiveni je produkt u obliku žute uljaste tekućine (3,027 g). Dobiveni produkt se otopi u dietil-eteru na koji se dodaje heksan dok otopina ne postane mliječno bijela i zamuti se. Otopina se ostavi u frižideru dva dana dok se faze ne odvoje. Otapalo se ukloni kapalicom, a produkt zaostane na dnu tikvice u obliku žute uljaste tekućine. Dobiveno je 1,1073 g (50,8 %) čistog produkta **1**  $\alpha$ -konfiguracije.

$R_f = 0,75$  (kloroform : acetonitril = 3 : 1).

**IR** (NaCl)  $\tilde{\nu}_{\max}$  / cm<sup>-1</sup>: 3062, 2991, 2961, 2941 (CH<sub>alifatski</sub>); 1752 (C=O).

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  / ppm: 6,09 (d, 1H,  $J = 1,8$  Hz, H-1 $\alpha$ ); 5,35 (m, 2H, H-3, H-4); 5,26 (m, 1H, H-2); 4,29 (dd, 1H,  $J = 4,8$  Hz,  $J = 12,4$  Hz, H-6a); 4,06-4,14 (m, H-5, H-6b); 2,18 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,17 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,10 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  / ppm: 170,64; 169,99; 169,74; 169,55; 168,09 (5 C=O; Ac); 90,61 (C1); 70,62; 68,76; 68,35; 65,55 (C2-C5); 62,11 (C6); 20,85; 20,76; 20,71; 20,66; 20,63 (5 CH<sub>3</sub>; Ac).

**ESI-MS**: izračunato za C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> 390,12; dobiveno [M+Na]<sup>+</sup> na  $m/z$  413,1.



### 3.2.2. 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza (**2**)

Spoj **1** (1,374 g, 3,52 mmol) otopi se u apsolutnom metanolu (35 mL). U otopinu se doda cinkov acetat dihidrat (86,3 mg, 0,393 mmol). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica i reakcijska smjesa se miješa 18 h na sobnoj temperaturi. Metanol se upari, a dobiveni produkt otopi u etil-acetatu (20 mL) te prebaci u lijevak za odjeljivanje. U lijevak se doda voda (30 mL) i dobro izmučka. Slojevi se odvoje, vodeni sloj se ekstrahira još dva puta s etil-acetatom (20 mL). Organski ekstrakti se spoje i suše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Smjesa se profiltrira, a otapalo upari. Sirovi produkt se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : acetonitril = 3 : 1 kao eluens. Dobiveno je 0,4423 g (36,3 %) čistog produkta **2**  $\alpha$ -konfiguracije u obliku žute uljaste tekućine.

$$[\alpha]_D^{25} = +18,9 (c\ 1,1; \text{CHCl}_3).$$

$$R_f = 0,54 \text{ (kloroform : acetonitril = 3 : 1)}.$$

**IR (NaCl)**  $\tilde{\nu}_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$ : 3487 (OH); 3068, 2991, 2961 ( $\text{CH}_{\text{alifatski}}$ ); 1752 (C=O).

**$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 5,42 (dd, 1H,  $J_{2,3} = 3,2 \text{ Hz}$ ,  $J_{3,4} = 10,0 \text{ Hz}$ , H-3); 5,34-5,24 (m, 3H, H1, H-4, OH); 4,29-4,12 (m, 3H, H-5, H-6a, H-6b); 3,71 (d, 1H,  $J_{2,3} = 3,9 \text{ Hz}$ , H2); 2,17 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,11 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,06 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,01 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).

**$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta / \text{ppm}$ : 170,86; 170,21; 170,05; 169,80 (4 C=O; Ac); 92,13 (C1); 70,00; 68,73; 68,44; 66,14 (C2-C5); 62,54 (C6); 20,88; 20,74; 20,68; 20,67 (4  $\text{CH}_3$ ; Ac).

**ESI-MS**: izračunato za  $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$  348,1; dobiveno dobiveno  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  na  $m/z$  371,1.

## 3.3. SINTEZA *O*-MANOZIDA

### 3.3.1. *Tert*-butil-2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetat (**3**)

Spoj **2** (0,372 g, 1,068 mmol) otopi se u suhom *N,N*-dimetilformamidu (5 mL). U otopinu se doda *tert*-butil-bromacetat (0,236 mL) i kalijev karbonat (0,738 g). Reakcijska smjesa se miješa na magnetskog mješalici 2 h na sobnoj temperaturi u zatvorenoj tikvici. Nakon završetka reakcije smjesa se odfiltrira u epruvetu za odsisavanje, preko Hirschovog lijevka. Tikvica se ispere s dietil-eterom (20 mL) i profiltrira u epruvetu. Dobivena otopina prebaci se u lijevak za odjeljivanje i ispere tri puta s vodom (15 mL). Organski sloj se prebaci u tikvicu i osuši na bezvodnom natrijevom sulfatu. Nakon toga se otopina profiltrira, a otapalo upari. Dobiven sirovi produkt **3** pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela, kao eluens koristi se kloroform : acetonitril = 3 : 1. Dobiveno je 0,3982 g (81,3 %) čistog spoja **3** u obliku žute uljaste tekućine.

$[\alpha]_D^{25} = +48,5$  (*c* 1,2; CHCl<sub>3</sub>).

$R_f = 0,64$  (kloroform : acetonitril = 3 : 1).

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  / ppm: 5,41-5,28 (m, 3H, H-2, H-3, H-4); 4,96 (d, 1H,  $J_{1,2} = 1,0$  Hz; H-1); 4,30 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 4,8$  Hz,  $J_{6a,6b} = 12,2$  Hz, H-6b); 4,20 - 4,02 (m, 4H, H-5, H-6a, OCH<sub>2</sub>); 2,26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,11 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,99 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,48 (s, 9H; CH<sub>3</sub>; *t*-Bu).

**<sup>13</sup>C NMR** (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  / ppm: 170,62; 169,78; 169,75; 169,69; 168,17 (5 C=O); 97,70 (C1); 82,30 (C; *t*-Bu); 69,32; 69,03; 68,87; 65,92 (C2, C3, C4, C5); 64,89; 62,29 (C6, OCH<sub>2</sub>); 28,03 (CH<sub>3</sub>; *t*-Bu); 20,84; 20,73; 20,68; 20,64 (4 CH<sub>3</sub>).

**ESI-MS:** izračunato za C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>12</sub> 462,2; dobiveno [M+Na]<sup>+</sup> na *m/z* 485,2.

### 3.3.2. 2-(2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octena kiselina (**4**)

Spoj **3** (1,11 g, 2,4 mmol) otopi se u suhom diklormetanu (5 mL) te se doda trifluorooctena kiselina (2 mL). Na tikvicu se stavi klor-kalcijeva cjevčica. Reakcijska smjesa miješa se na magnetskoj mješalici 3 h. Nakon završetka reakcije, smjesa se razrijedi s diklormetanom (30 mL) i prebaci u lijevak za odjeljivanje. Reakcijska smjesa se ispere s vodom (20 mL). Nakon što se slojevi odjele donji organski sloj se ispusti u tikvicu, a vodeni sloj se dodatno ekstrahira s diklormetanom (20 mL). Organski slojevi se spoje u tikvicu i osuše na bezvodnom natrijevom sulfatu. Nakon toga se otopina profiltrira, a otapalo upari na rotacijskom uparivaču. Dobiveni sirovi spoj **4** pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela, uz kloroform : metanol = 15 : 1 kao eluens. Dobiveno je 0,8556 g (72,2 %) čistog produkta **4** u obliku žute uljaste tekućine.

$[\alpha]_D^{25} = +29,0$  (*c* 1,0; MeOH).

$R_f = 0,62$  (kloroform : metanol = 15 : 1).

**<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 5,35-5,25 (m, 3H, H-2, H-3, H-4); 4,95 (d, 1H,  $J_{1,2} = 0,9$  Hz; H-1); 4,58 (s, <1H, OH); 4,32-4,16 (m, 4H, H-5, H-6a, OCH<sub>2</sub>); 4,11 (dd, 1H,  $J_{5,6} = 1,7$  Hz,  $J_{6a,6b} = 11,5$  Hz, H-6b); 2,14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2,04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 1,96 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 172,45; 172,57; 171,50 (5 C=O); 99,17 (C1); 70,69; 70,49; 70,42; 67,16 (C2, C3, C4, C5); 63,50 (C6, OCH<sub>2</sub>); 20,68; 20,65; 20,60 (4 CH<sub>3</sub>).

**ESI-MS:** izračunato za C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>12</sub> 406,1; dobiveno [M+Na]<sup>+</sup> na *m/z* 429,2.

### 3.4. PRIPRAVA BENZILNOG ESTERA L-LIZINA

#### 3.4.1. Di-*p*-toluensulfonat benzilnog estera L-lizina (**5**)

U okruglu tikvice se stavi L-lizin u obliku monohidroklorida (0,5156 g, 2,737 mmol), *p*-toluensulfonska kiselina u obliku monohidrata (1,1748 g, 6,0224 mmol), benzilni alkohol (11 mL) i toluen (11 mL). Na tikvicu se stavi Dean-Starkov nastavak za uklanjanje vode i povratno hladilo. Reakcijska smjesa se miješa na magnetskoj mješalici i zagrijava na uljnoj kupelj (140 °C) 24 h. Nakon što se reakcijska smjesa ohladi na nju se doda suhi etil-acetat (5 mL) i tikvica se ostavi u frižider da produkt iskristalizira. Dobiveni kristali se odfiltriraju preko Hirshofovog lijevka i prekrizaliziraju iz etanola (10 mL). Na otopinu se doda suhi etil-acetat (7 mL) te se stavi u frižider da produkt iskristalizira. Dobiveni kristali bijele boje se odfiltriraju preko Buchnerova lijevka i isperu s par kapalica etil-acetata te stave na sušenje. Dobiveno je 0,8579 g (51,1 %) čistog spoja **5** u obliku bijelih kristala.

**t.t.** = 158-159 °C (lit. 159-160 °C)<sup>[23]</sup>

$[\alpha]_D^{25} = -1,9$  (*c* 1,1; MeOH).

**R<sub>f</sub>** = 0,828 (kloroform : metanol = 1 : 1).

**<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 7,71 (s, 2H; H<sub>arom</sub>; Ts); 7,69 (s, 2H; H<sub>arom</sub>; Ts); 7,89 (s, 7,43-7,34 (m, 5H, H<sub>arom</sub>; Bn); 7,24 (s, 2H; H<sub>arom</sub>; Ts); 7,22 (s, 2H; H<sub>arom</sub>; Ts); 5,32-5,22 (m, 2H; CH<sub>2</sub>; Bn); 4,09 (t, 1H, *J* = 6,4 Hz; CH- $\alpha$ ); 2,85 (pt, 1H, *J* = 6,5 Hz; CH<sub>2</sub>); 2,36 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>); 2,01-1,33 (m, 6H, 3 CH<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 170,32 (C=O); 143,43; 141,87; 136,49 (3 C<sub>arom</sub>); 129,92; 129,88; 129,78; 126,97 (CH<sub>arom</sub>); 69,20 (C6, OCH<sub>2</sub>); 53,76 (CH- $\alpha$ ); 40,29; 31,01; 27,93; 23,00 (4 CH<sub>2</sub>); 21,36 (2 CH<sub>3</sub>).

**ESI-MS**: izračunato za C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 236,2; dobiveno [M+H]<sup>+</sup> na *m/z* 237,2.

### 3.5. SINTEZA DIMANOZILIRANOG LIZINA

#### 3.5.1. Benzilni ester (2*S*)-2,6-di[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanske kiseline (**6**)

U okrugloj tikvici se otopi spoj **4** (0,2302 g, 0,56 mmol) u suhom DCM-u (4 mL). U tu otopinu se doda 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC·HCl, 0,1299 g) i 1-hidroksibenzotriazol (HOBt 0,078 g) i tikvica se začepi. Reakcijska smjesa se miješa na ledenoj kupelji 15 min. Nakon toga se u reakcijsku smjesu doda suhi DMF (4 mL), spoj **5** (0,1736 g, 0,28 mmol) i trietilamin (0,202 mL). Nakon 48 h reakcijska smjesa se razrijedi s etil-acetatom (20 mL) i prebaci u lijevak za odjeljivanje. Dobivena smjesa se ispere dva puta s vodom (20 mL). Organski sloj se osuši na bezvodnom natrijevom sulfatu, profiltrira i upari na rotacijskom uparivaču. Spoj **6** pročisti se kromatografijom na stupcu

silikagela, kao eluens koristi se kloroform : metanol = 5 : 1. Dobiveno je 0,2327 g (81,1 %) čistog produkta **6** u obliku žute viskozne tekuće.

$$[\alpha]_D^{25} = +31,8 (c\ 0,8; \text{MeOH}).$$

$$R_f = 0,83 (\text{kloroform} : \text{metanol} = 5 : 1).$$

**<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 7,90 (s, <1H, NH); 7,38-7,31 (m, 5 H; 5 H<sub>arom</sub>); 5,41- 5,14 (m, 6 H, H-2, H-3, H-2', H-3', CH<sub>2</sub>; OBn); 4,93 (d,  $J = 1,1$  Hz, 1H; H-1); 4,90 (d,  $J = 1,2$  Hz, 1H; H-1'); 4,51 (dd, 1H,  $J = 5,1$  Hz,  $J = 8,8$  Hz, CH; Lys); 4,28- 4,03 (m, 12H; H-4, H-4', H-5, H-5', H-6a, H-6a', H-6b, H-6b', 2 OCH<sub>2</sub>); 3,26-3,19 (m, 2H;  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>; Lys); 2,13 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>; Ac); 2,06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>; Ac); 2,05 (s, 3H, CH<sub>3</sub>; Ac); 2,03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>; Ac); 2,01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>; Ac); 1,97 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>; Ac); 1,94- 1,74 (m, 2H, CH<sub>2</sub>; Lys); 1,61-1,23 (m, 4H; CH<sub>2</sub>; Lys).

**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 173,19, 172,42; 172,38; 171,76; 171,68; 171,58; 171,56; 171,52; 171,40; 171,06 (11 C=O); 137,30 (C<sub>arom</sub>); 129,68; 129,43; 129,35 (CH<sub>arom</sub>); 99,25; 99,13 (C1); 70,71; 70,44; 70,43; 70,40; 70,37; 67,15 (C2, C3, C4, C5); 68,08; 67,57; 67,48; 63,46 (C6, OCH<sub>2</sub>; linker; OCH<sub>2</sub>; Bn); 53,61(CH; Lys); 39,79; 31,90; 29,92; 24,24 (CH<sub>2</sub>; Lys); 20,68 (CH<sub>3</sub>; Ac).

**ESI-MS**: izračunato za C<sub>45</sub>H<sub>60</sub>N<sub>2</sub>O<sub>24</sub> 1012,4; dobiveno [M+Na]<sup>+</sup> na  $m/z$  1036,5.

### 3.5.2. (2*S*)-2,6-Di[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanska kiselina (**7**)

Spoj **6** (0,106 g, 0,1046 mmol) se otopi u metanolu (10 mL) i prebaci u bocu za hidrogenolizu. U tu otopinu doda se 10% Pd/C (0,0489 g). Reakcijska smjesa se miješa 1,5 h pri tlaku-vodika od 30 PSI nakon čega se otopina profiltrira preko finog naboranog filter papira. Spoj **7** pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela, kao eluens koristi se kloroform : metanol = 5 : 1. Dobiveno je 0,0793 g (82,2 %) čistog produkta **7** u obliku žute viskozne tekuće.

$$[\alpha]_D^{25} = +51,0 (c\ 1,0; \text{MeOH}).$$

$$R_f = 0,6 (\text{kloroform} : \text{metanol} = 5 : 1).$$

**<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 5,41- 5,24 (m, 4 H, H-2, H-3, H-2', H-3'); 4,95 (s, 1H, H-1); 4,91 (d,  $J = 0,8$  Hz, H-1'); 4,34 (dd, 1H,  $J = 4,6$  Hz,  $J = 8,1$  Hz, CH; Lys); 4,28- 4,03 (m, 12H; H-4, H-4', H-5, H-5', H-6a, H-6a', H-6b, H-6b', 2 OCH<sub>2</sub>); 3,26-3,21 (m, 2H;  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>; Lys); 2,15 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>; Ac); 2,14 (s, 3H, CH<sub>3</sub>; Ac); 2,06 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>; Ac); 2,04 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>; Ac); 1,97 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub>; Ac); 1,96-1,76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>; Lys); 1,62-1,54 (m, 2H, CH<sub>2</sub>; Lys); 1,44-1,38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>; Lys).

**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 170,49; 170,46; 169,78; 169,71; 169,63; 169,62; 169,60; 169,14; 168,83 (11 C=O); 97,28; 97,25 (C1); 68,78; 68,52; 68,47; 68,42; 68,41 (C2, C3, C4); 65,69; 65,66 (OCH<sub>2</sub>; linker); 65,20; 65,15 (C5); 61,51; 61,48 (C6); 53,00(CH; Lys); 38,02; 30,84; 28,17; 22,27 (4 CH<sub>2</sub>; Lys); 18,79; 18,78; 18,77; 18,75; 18,74 (CH<sub>3</sub>; Ac).

**ESI-MS:** izračunato za C<sub>38</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>O<sub>24</sub> 922,3; dobiveno [M+Na]<sup>+</sup> na *m/z* 945,4.

### 3.6. KONDENZACIJA DIMANOZILIRANOG L-LIZINA S DESMURAMILDIPEPTIDOM

#### 3.6.1. Benzilni ester (2S)-2,6-di[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi) acetilamino]heksanoil-L-alanil-D-izoglutamina (8)

U okrugloj tikvici se otopi spoj **7** (0,1823 g, 0,1975 mmol) u suhom DCM-u (3 mL). U otopinu se doda 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC·HCl, 0,0453 g) i 1-hidroksibenzotriazol (HOBt, 0,0269 g). Tikvicu se začepi i reakcijska smjesa se miješa na ledenoj kupelji 15 min. Nakon toga se u reakcijsku smjesu doda otopina L-Ala-D-isoGlu-OBn·TFA (0,0832 g, 0,1975 mmol) u suhom DMF-u (3 mL) i trietilamin (0,052 mL). Nakon 48 h reakcijska smjesa se razrijedi s etil-acetatom (20 mL) i prebaci u lijevak za odjeljivanje. Dobivena smjesa se ispere dva puta s vodom (20 mL). Organski sloj se osuši na bezvodnom natrijevom sulfatu, profiltrira i upari na rotacijskom uparivaču. Spoj **8** pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela, kao eluens koristi se kloroform : metanol = 9 : 1. Dobiveno je 0,2327 g ( $\eta$  = 81,1 %) čistog produkta **8** u obliku žute viskozne tekuće.

$[\alpha]_D^{25} = +24,0$  (*c* 1,0; MeOH).

*R<sub>f</sub>* = 0,83 (kloroform : metanol = 9 : 1).

**<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 7,37-7,30 (m, 5 H; 5H<sub>arom</sub>); 5,43-5,25 (m, 7 H, H-2, H-3, H-2', H-3', CH Lys, CH Ala, CH isoGln); 5,13 (s, 2H, CH<sub>2</sub>; Bn); 4,94 (d, *J* = 1,3 Hz, H-1); 4,92 (d, *J* = 1,5 Hz, H-1'); 4,28- 4,03 (m, 10H; H-4, H-4', H-5, H-5', H-6a, H-6a', H-6b, H-6b', OCH<sub>2</sub>); 3,30-3,17 (m, 4H;  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub>; Lys, OCH<sub>2</sub>); 2,49 (pt, 1H, *J* = 7,60 Hz, CH<sub>2</sub>- $\beta'$ ; isoGln); 2,15 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>; Ac); 2,14 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>; Ac); 2,31-2,15 (m, 1H, CH<sub>2</sub>- $\beta$ ; isoGln); 2,06 (s, 6 H, 2 CH<sub>3</sub>; Ac); 2,04 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>; Ac); 2,03 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>; Ac); 1,98 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>; Ac); 1,97 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>; Ac); 2,02-1,71 (m, 4 H; CH<sub>2</sub>; Lys, CH<sub>2</sub>- $\gamma$ ; isoGln); 1,61-1,54 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>; Lys); 1,45-1,23 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>; Lys); 1,36 (d, 2 H, *J*=7,1 Hz, CH<sub>3</sub>; Ala).

**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 176,31; 175,13; 174,23; 174,19; 172,45; 171,74; 171,65; 171,59; 171,53; 171,30; 171,12 (14 C=O); 137,63 (C<sub>arom</sub>; Bn); 129,60; 129,28; 129,25 (CH<sub>arom</sub>; Bn); 99,29; 99,18 (C1); 70,15; 70,43; 70,38; (C2, C3, C4); 67,63; 67,58; 67,45; 63,48 (OCH<sub>2</sub>; linker; C6); 67,18; 67,12 (C5); 54,41; 53,74; 51,07 (CH *iso*Gln, CH Ala, CH Lys); 39,81; 32,79; 31,57; 24,00 (CH<sub>2</sub>; Lys); 30,06 (CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 27,95 (CH<sub>2</sub> *iso*Gln), 20,69 (CH<sub>3</sub>; Ac); 17,36 (CH<sub>3</sub> Ala).

**ESI-MS:** izračunato za C<sub>53</sub>H<sub>73</sub>N<sub>5</sub>O<sub>27</sub> 1211,5; dobiveno [M+H]<sup>+</sup> na *m/z* 1212,5.

### 3.7. DEPROTEKCIJA ZAŠTIĆENOG DIMANOZILIRANOG DESMURAMILDIPEPTIDA

#### 3.7.1. (2*S*)-2,6-Di[2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanoil-L-alanil-D-izoglutamin (**9**)

Spoj **8** (0,061 g, 0,0503 mmol) se otopi u metanolu (10 mL) i prebaci u bocu za hidrogenolizu. U tu otopinu se doda 10 % Pd/C (0,010 g). Reakcijska smjesa se miješa 1,5 h pri tlaku vodika od 28 PSI nakon čega se otopina profiltrira preko finog naboranog filter papira. Spoj **9** pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela, kao eluens koristi se kloroform : metanol = 9 : 1. Dobiveno je 0,0428 g ( $\eta$  = 75,9 %) čistog produkta **9** u obliku žute viskozne tekućine.

$R_f$  = 0,24 (kloroform : metanol = 9 : 1).

**$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 5,43-4,99 (m, 7 H, H-2, H-3, H-2', H-3', CH Lys, CH Ala, CH isoGln); 4,96 (s, 1H, H-1); 4,95 (s, 1H, H-1'); 4,40-3,52 (m, 10H; H-4, H-4', H-5, H-5', H-6a, H-6a', H-6b, H-6b',  $\text{OCH}_2$ ); 3,26-3,17 (m, 2H;  $\epsilon$ - $\text{CH}_2$ ; Lys); 2,43 (pt, 2H,  $J$  = 7,7 Hz,  $\text{CH}_2$  isoGln); 2,32-2,18 (m, 1H, CH isoGln); 2,11-2,05 (m, 1H, CH isoGln); 2,15 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ; Ac); 2,14 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ; Ac); 2,0 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ; Ac); 2,07 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ; Ac); 2,05 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ; Ac); 2,04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ; Ac); 1,98 (s, 6H,  $2\text{CH}_3$ ; Ac); 1,96-1,71 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$ ; Lys); 1,62-1,53 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ; Lys); 1,28 (d, 3H,  $J$  = 7,1 Hz,  $\text{CH}_3$  Ala).

**$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 176,94; 175,22; 174,95; 174,70; 174,39; 174,27; 172,61; 172,56; 171,89 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 99,18; 99,02 ( $\text{C}_1$ ); 75,44; 75,40; 73,47; 73,42; 70,69; 70,59 ( $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_4$ ); 67,23; 67,01 ( $\text{OCH}_2$ ; linker); 65,79; 65,71 ( $\text{C}_5$ ); 62,34; 61,98 ( $\text{C}_6$ ); 53,71; 51,10; 49,90 (CH isoGln, CH Ala, CH; Lys); 39,83; 32,97; 31,26; 30,07; 28,00; 27,93; 23,90 (4  $\text{CH}_2$ ; Lys, 2  $\text{CH}_2$  isoGln), 20,92; 20,70; 20,54 ( $\text{CH}_3$ ; Ac); 17,37 ( $\text{CH}_3$  Ala).

**MS**: izračunato za  $\text{C}_{46}\text{H}_{67}\text{N}_5\text{O}_{27}$  1121,4; dobiveno  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  na  $m/z$  1044,4.

#### 3.7.2. (2*S*)-2,6-Di[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanoil-L-alanil-D-izoglutamin (**10**)

U tikvici se otopi spoj **9** (0,045 g, 0,0401 mmol) u apsolutnom metanolu (1 mL). U tu otopinu se doda 25 % otopina natrijevog metoksida u metanolu (2  $\mu\text{L}$ ) i reakcija smjesa se miješa na magnetskoj mješalici 1 h. Nakon završetka reakcije reakcijska smjesa se pročisti kromatografijom na stupcu silikagela, kao eluens se koristi kloroform : metanol = 1 : 2. Dobiveno je 0,030 g (84,9 %) čistog produkta **10** u obliku bezbojne viskozne tekuće.

$R_f$  = 0,57 (kloroform : metanol = 1 : 2).

**$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  / ppm: 4,76 (s, 1H, H-1); 4,72 (d,  $J$  = 1,2 Hz, H-1'); 4,31 (dd, 1H,  $J$  = 5,8 Hz;  $J$  = 7,7 Hz, CH isoGln), 4,25 (dd, 1H,  $J$  = 4,6 Hz;  $J$  = 9,6 Hz, CH Lys), 4,18 (q, 1H,  $J$  = 7,2 Hz, CH Ala), 4,13-3,86 (m, 6 H,

H-2, H-3, H-2', H-3', H-4, H-4'); 3,76- 3,46 (m, 10H; H-5, H-5', H-6a, H-6a', H-6b, H-6b', 2 OCH<sub>2</sub>); 3,18-3,12 (m, 4H; ε-CH<sub>2</sub>; Lys, OCH<sub>2</sub>); 2, 33 (pt, 2H,  $J = 7,6$  Hz, CH<sub>2</sub>-β'; isoGln); 2,20-1,58 (m, 8H, CH<sub>2</sub>-β; isoGln; 2 CH<sub>2</sub>; Lys, CH<sub>2</sub>-γ; isoGln); 1,48-1,43 (m, 2 H; CH<sub>2</sub>; Lys); 1,28(d, 2 H,  $J=7,1$  Hz, CH<sub>3</sub>; Ala).

**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  / ppm: 176,312; 175,13; 174,94; 174,89; 174,04; 171,85 (6 C=O); 101,79; 101,74 (C1); 75,42; 75,39; 72,45; 72,40; 71,73; 71,65; 68,58; 68,54 (C2, C3, C4, C5, C29, C3', C4', C5'); 67,10; 66,85; 62,87 (OCH<sub>2</sub>; linker; C6); 54,08; 53,68; 51,00 (CH *iso*Gln, CH Ala, CH Lys); 39,75; 33,02; 31,26; 24,06 (CH<sub>2</sub>; Lys); 30,13; 27,95 (CH<sub>2</sub> *iso*Gln); 17,40 (CH<sub>3</sub> Ala).

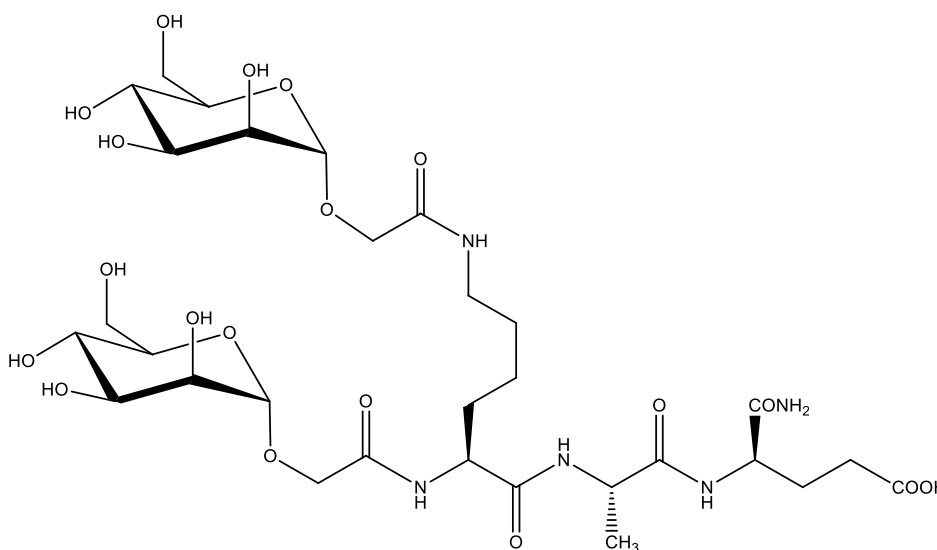
**ESI-MS:** izračunato za C<sub>30</sub>H<sub>51</sub>N<sub>5</sub>O<sub>19</sub> 785,32; dobiveno [M+K]<sup>+</sup> na  $m/z$  824,5.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U okviru ovog diplomskog rada razvijena je metoda za pripremu dimanoziliranih derivata desmuramilpeptida **10** s potencijalnom adjuvantskom aktivnošću. Ciljna molekula sadrži desmuramildipeptid odgovoran za imunomodulacijsko djelovanje modificiran na *N*-kraju s dimanoziliranim L-lizinom (slika 10). Manoze su vezane na L-lizin preko poveznice od dva ugljikova atoma. Manozu omogućuje ciljanu dostavu biološki aktivne komponente do specifičnih receptora. (2*S*)-2,6-di[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanoil-L-alanil-D-izoglutamin dobiven je u više sintetskih koraka.



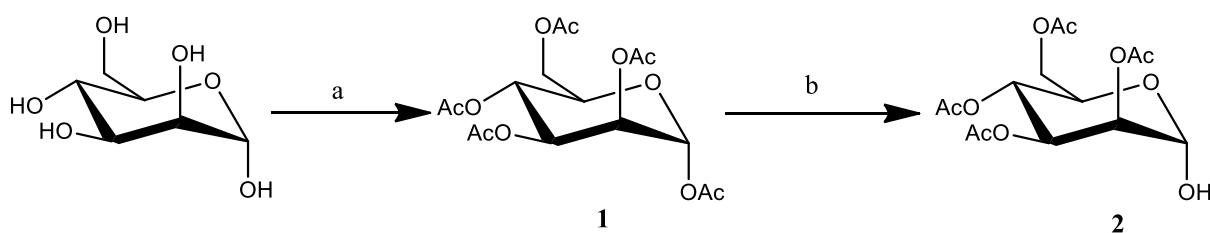
Slika 10. Ciljna molekula, (2*S*)-2,6-di[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanoil-L-alanil-D-izoglutamin (**10**)

### 4.1. SINTEZA DIMANOZILIRANOG LIZINA

#### 4.1.1. Priprava tetraacetilirane $\alpha$ -D-manopiranoze

Polazni spoj u sintezi manozilirane karboksilne kiseline je 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza. Kako bi se provela regioselektivna transformacija skupine na anomernom centru, prvo su uvedene zaštite na slobodne hidroksilne skupine. Korištena je acetatna zaštita budući da se vrlo selektivno i jednostavno uklanja pomoću 25 % otopine NaOMe u metanolu, pri čemu se ne narušava stabilnost drugih reaktivnih skupina u molekuli. Acetatne zaštitne skupine uvedene su u molekulu reakcijom acetanhidrida i manoze uz prisutnost joda kao aktivatora u iskorištenju od 50,8 %. Struktura spoja **1** potvrđena je spektrometrijom masa (dobiven je molekulski ion  $[M+Na]^+$  na  $m/z$  413,1),  $^1H$  NMR,  $^{13}C$  NMR i IR spektroskopijama, te dodatno tankoslojnom kromatografijom usporedbom sa standardom. Dobivenoj 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranozi **1** selektivno je uklonjena anomerna acetatna zaštita pomoću cinkova acetata dihidrata u apsolutnom metanolu (shema 15) te je dobivena 2,3,4,6-tetra-

*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoza **2** u 36 %-tnom iskorištenju. Tijek reakcije kontroliran je TLC-om u sustavu otapala kloroform : acetonitril = 3 : 1. Uočeno je da daljnjim napredovanjem reakcije (vođenjem reakcije duže od 18 h) dolazi do postepenog uklanjanja i preostalih acetata što dovodi do nastanka triacetiliranih produkata. Nadalje, dužim vođenjem reakcije povećava se i udio  $\beta$ -anomera tetraacetilirane manoze. Iz navedenih razloga reakcija se zaustavlja nakon 18 h te se neizreagirana pentaacetilirana manaza **1** odvaja prilikom kromatografskog pročišćavanja spoja **2** i ponovo koristi u sljedećoj selektivnoj deprotekciji. Ukupno iskorištenje u dva sintetska koraka iznosi 49 %. Struktura spoja **2** potvrđena je spektrometrijom masa (dobiven je molekulski ion  $[M+Na]^+$  na  $m/z$  371,1),  $^1H$  NMR i  $^{13}C$  NMR spektroskopijom te IR spektroskopijom, i dodatno tankoslojnom kromatografijom usporedbom sa standardom.



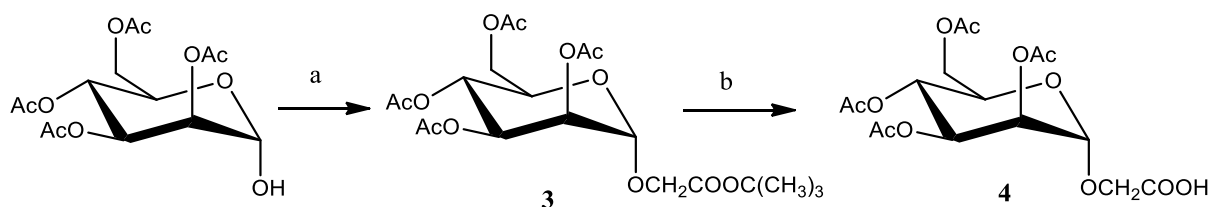
Shema 15. Priprava 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoze;

(a)  $(CH_3CO)_2O$ ,  $I_2$ , 1,5 h,  $\eta = 50,8 \%$ ; (b)  $Zn(OAc)_2 \cdot H_2O$ , apsolutni  $CH_3OH$ , 18 h,  $\eta = 38 \%$

#### 4.1.2. *O*-manoziliranje octene kiseline

Dizajn ciljne molekule temelji se na prisutnosti dviju molekula  $\alpha$ -D-manoze u molekuli zbog čega je bilo potrebno odabrati podstrukturu koja omogućuje vezanje dviju manoznih podjedinica. Obzirom da se manaza uvodi na peptidni fragment, kao idealnom podstrukturom nametnula se aminokiselina koja u bočnom ogranku ima amino-skupinu, odnosno molekula L-lizina. Lizin omogućuje vezanje dviju molekula manoze, međutim da bi mogli vezati manoze preko amino-skupina lizina bilo je potrebno prethodno na manozu uvesti poveznicu funkcionaliziranu karboksilnom skupinom. Odabrana je najjednostavnija poveznica, od svega dva ugljikova atoma. Nakon neuspješno provedenih metoda manozilacije glikolne kiseline (direktnom i trikloracetimidatnom metodom), pristupilo se metodi priprave *O*-glikozida na alternativan način, povezivanjem tetraacetilirane manoze s aglikonom na način da se u strukturu aglikona uvede dobra izlazna skupina. Prvo je pokušana *O*-glikozilacija benzilnog estera bromoctene kiseline, međutim prilikom sinteze navedenog estera Fischerovom esterifikacijom nije bilo moguće uspješno izolirati produkt zadovoljavajuće količine i čistoće. Stoga je umjesto benzilnog estera reakcija provedena s *tert*-butilnim esterom koji je ujedno i kupovna kemikalija. Reakcijom 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoze i *tert*-butil-bromacetat uz kalijev karbonat u suhom *N,N*-dimetilformamidu provedena je *O*-glikozidacija (shema 16). Reakcija glikozidacije pri navedenim reakcijskim uvjetima rezultirala je preferentno  $\alpha$ -anomerom *O*-manozida, uz vrlo zanemariv udio  $\beta$ -

anomera. Veća zastupljenost  $\alpha$ -manozida objašnjava se njegovom većom termodinamičkom stabilnošću koja je posljedica snažnog anomernog efekta.[14] Sirova reakcijska smjesa pročišćena je kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : acetonitril= 3 : 1 kao eluens te je izoliran produkt u 81,3 %-tnom iskorištenju. Struktura spoja **3** potvrđena je spektrometrijom masa (dobiven je molekulski ion  $[M+Na]^+$  na  $m/z$  485,2),  $^1H$  NMR i  $^{13}C$  NMR spektroskopijom, te tankoslojnom kromatografijom usporedbom sa standardom. Anomerno čistom esteru **3** uklonjena je *tert*-butilne zaštite pomoću trifluoroctene kiseline u suhom diklormetanu (shema 16). Nakon pročišćavanja kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 15 : 1 kao eluens izoliran je čisti produkt **4** u 72 %-tnom iskorištenju. Struktura spoja potvrđena je MS-om (molekulski ion  $[M+Na]^+$  na  $m/z$  = 429,2),  $^1H$  NMR i  $^{13}C$  NMR spektroskopijama.

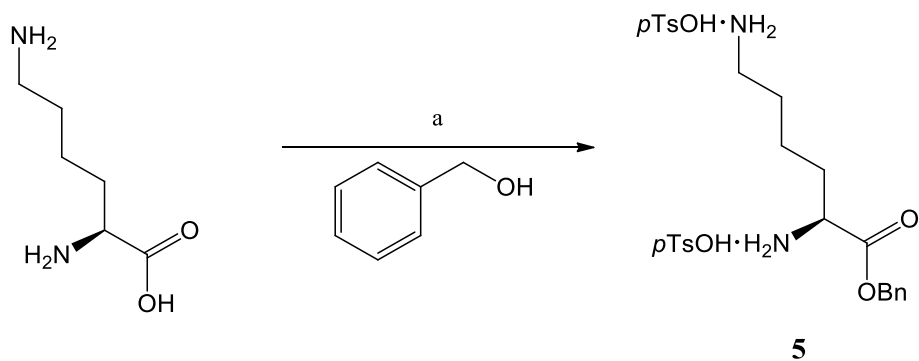


Shema 16. O-glikozidacija *tert*-butil-bromacetata; (a)  $BrCH_2COOC(CH_3)_3$ ,  $K_2CO_3$ , DMF (suhi), 2 h,  $\eta$  = 81,3 %; (b) TFA, DCM, 3 h,  $\eta$  = 72 %

#### 4.1.3. Sintaza di-*p*-toluenesulfonat benzilnog estera L-lizina

Za pripravu benzilnog estera korištena je Fisherova esterifikacija koja se odvija u prisutnosti kiseline. Obično se kod Fischerove esterifikacije koriste katalitičke količine kiselina, međutim u reakciji pripreve di-*p*-toluenesulfonata benzilnog estera L-lizina (shema 17) *p*-toluensulfonska kiselina dodana je u stehiometrijskoj količini. Njena uloga je dvojaka i protonira  $\alpha$ - i  $\epsilon$ -amino-skupine čime onemogućuje nastanak amidne veze te djeluje kao katalizator u esterifikaciji (protonira karbonilni ugljikov atom i na taj način olakšava nukleofilni napad hidoksilne skupine benzilnog alkohola). Reakcija je provedena u toluenu na 140 °C. Reakcijska smjesa se zagrijavala 24 h, a vodu smo uklanjali pomoću Dean-Starkovog nastavka za uklanjanje vode. Voda se uklanjala kao bi se povećalo iskorištenje reakcije obzirom da se iskorištenje Fischerove esterifikacije može povećati dodavanjem jednog od reaktanata u suvišku (alkohol ili kiselina) ili odvođenjem/uklanjanjem vode. Nakon što se reakcijska smjesa ohladi produkt se istaloži dodatkom suhog etil-acetata uz stajanje u frižideru. Dobiveni kristali se prekrizaliziraju iz etanola te se ponovna kristalizacija potakne dodatkom etil-acetata uz hlađenje. Dobiveni su bijeli kristali spoja **5** uz 51 % prinosa. Struktura spoja **5** potvrđena je MS-om (molekulski ion  $[M+H]^+$  na  $m/z$  =

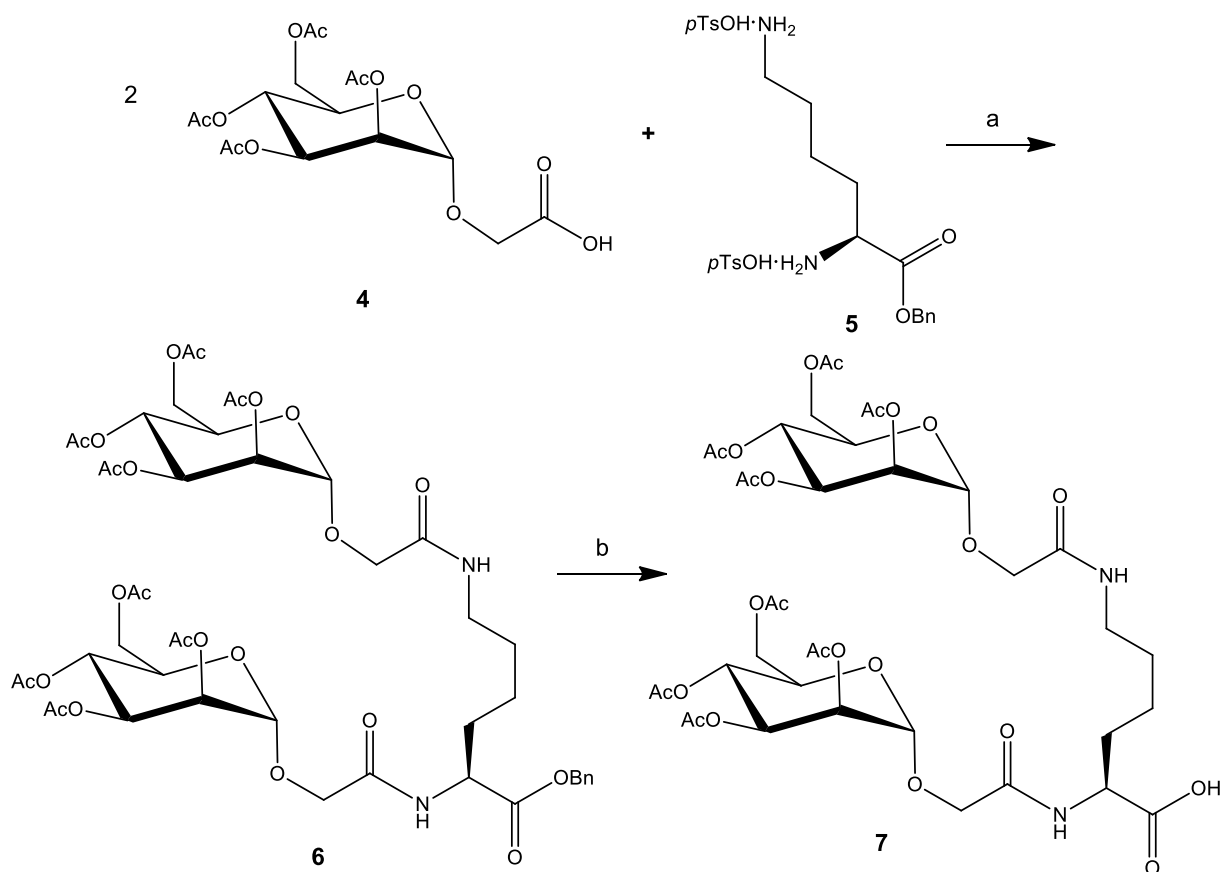
237,2),  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijama. Također je određena temperatura taljenja (158-159 °C) i izmjereno optičko skretanje te su dobivene vrijednosti uspoređene s onima literaturnima.[23]



Shema 17. Esterifikacija L-lizina; (a) *p*-TsOH/toluen, 140 °C, 24 h,  $\eta = 51\%$

#### 4.1.4. Kondenzacija 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octene kiseline s benzilnim esterom di-*p*-toluenesulfonat L-lizina

Za kondenzaciju 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octene kiseline **4** s benzilnim esterom di-*p*-toluenesulfonat L-lizina **5** potrebno je dodati dva ekvivalenta spoja **4** na jedan ekvivalent spoja **5** (shema 18). Kondenzacija je provedena optimiranom karbodiimidnom metodom uz 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid (EDC·HCl) i 1-hidroksibenzotriazol (HOBt) kao koreagens te u prisutnosti baze, trietilamina. Dodatak katalitičke količine baze nužan je za deprotonaciju amino-skupina L-lizina, čime je omogućen nukleofilni napad amina na aktiviranu karboksilnu skupinu 2-(2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)octene kiseline. Navedenom reakcijom pripravljen je dimanozilirani L-lizin **6** uz iskorištenje od 81 %. Struktura spoja **6** u kojoj su manoze preko poveznice vezane na N-kraj lizina, te na  $\epsilon$ -amino-skupinu u bočnom ogranku potvrđena je MS-om (molekulski ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  na  $m/z = 1036,5$ ) te  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijama. Dobiveni produkt **6** podvrgnut je katalitičkoj hidrogenolizi u metanolu uz 10 % Pd/C čime je uklonjena benzilna zaštita te je dobiven produkt **7** uz iskorištenje od 82 %. Struktura spoja **7** potvrđena je MS-om (molekulski ion  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  na  $m/z = 945,4$ ) te  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijama.



Shema 18. Sinteza di-manoziliranog L-lizina; (a) EDC·HCl, HOBt, Et<sub>3</sub>N, DCM(suhi) 0 °C → sobna temp., 48 h,  $\eta$  = 81 %; (b) H<sub>2</sub>, 10 % Pd/C, MeOH 1,5 h, sobna temp.  $\eta$  = 82 %

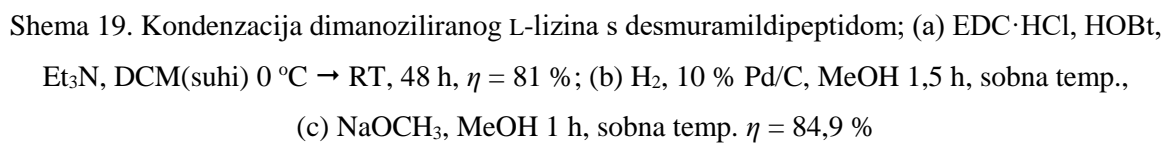
Spoj **7**, dimanozilirani lizin (Man<sub>2</sub>Lys), ključan je međuprodukt u sintezi dimanoziliranih desmuramilpeptida i njihovih derivata. Uspješnost metode potvrđena je vrlo dobrim iskorištenjima te jednostavnošću postupka (mali broj sintetskih koraka). Nadalje, ovaj spoj može se upotrijebiti i za sintezu tetraantenarnih manokonjugata (primjerice Man<sub>4</sub>Lys), što je također planirano u nastavku istraživanja.

## 4.2. SINTEZA DIMANOZILIRANOG DESMURAMILDIPEPTIDA

### 4.2.1. Sinteza (2S)-2,6-di[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanoil-L-alanil-D-izoglutamina

Prilikom kondenzacije (2S)-2,6-di[2-(2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanske kiseline **7** i benzilnog estera desmuramildipeptida, L-Ala-D-*iso*Gln-Obn, korištena je već ranije opisana EDC/HOBt karbodiimidna metoda. Navedena metoda pokazala se u dosadašnjem radu na sintezi muramilpeptidnih analoga kao najpogodnija metoda. Reakcijska smjesa se miješa 48 h pri

sobnoj temperaturi. Potom se ekstrahira s vodom kao bi se dobro topljivi koprodukt reakcije, *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilurea, preveo u vodu s kojom se ujedno ukloni i glavina *N,N*-dimetilformamida iz reakcijske smijese. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 9 : 1 kao eluens te je dobiven čisti produkt **8** uz iskorištenje od 81 %. Struktura spoja **8** potvrđena je MS-om (molekulski ion  $[M+H]^+$  na  $m/z = 1212,5$ ) te  $^1H$  NMR i  $^{13}C$  NMR spektroskopijama. Zadnja faza sinteze bila je uklanjanje zaštitnih skupina. Benzilna zaštita uklonjena je katalitičkom hidrogenolizom u metanolu uz 10 % Pd/C kao katalizator. Dobiven je produkt **9** koji je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz kloroform : metanol = 9 : 1 kao eluens. Nakon toga je sa spoja **9** djelovanjem katalitičke količine 25 %-tne otopine natrijevog metoksida u metanolu uklonjena acetatna zaštita, takozvanim Zemlenovim postupkom. Reakcijska smjesa je direktno nanešena na stupac silikagela i eluirana sa smjesom otapala kloroform : metanol = 1 : 2. Dobiven je konačni produkt **10** uz 84,9 % iskorištenja. Djelovanjem natrijevog metoksida pokidane su samo esterske veze, dok su amidne veze između ključnih podstruktura ostale stabilne i nepromijenjene, što potvrđuje da je Zemlenova metoda dovoljno blaga i selektivna za deprotekciju i složenijih glikopeptidnih struktura. Strukture spojeva **9** i **10** potvrđene su MS-om (molekulski ion **9**  $[M+Na]^+$  na  $m/z = 1036,5$  te molekulski ion **10**  $[M+K]^+$  na  $m/z = 824,5$ ),  $^1H$  NMR i  $^{13}C$  NMR spektroskopijama.



Spoj **10** konačni je produkt kojem će se ispitati adjuvatska aktivnost te će usporediti s aktivnostima prethodno sintetiziranog analoga koji ima samo jednu manoznu podjedinicu kao i s drugim derivatima dimanoziliranih desmuramildipeptida koji će biti pripremljeni kondenzacijom različitih lipofilnih podstruktura i spoja **9**. Iz tog razloga spoj **9** važan je međuprodukt za sinteze koje slijede u nastavku ovog istraživanja.



## **5. ZAKLJUČAK**

## 5. ZAKLJUČAK

- Razvijena je učinkovita sintetska metoda pripreme dimanoziliranih desmuramildipeptida. Učinkovitost metode potvrđena je na sintezi (2*S*)-2,6-di[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanoil-L-alanil-D-izoglutamina, prvog u seriji dimanoziliranih desmuramildipeptida s potencijalnom adjuvantskom aktivnošću. Sintetska metoda odlikuje se selektivnošću i vrlo dobrim prinosima. Metoda pripreme dimanoziliranih desmuramilpeptida temelji se na konsektivnom vezanju ključnih podstruktura stabilnim amidnim vezama. Dvije manoze konjugirane su preko kratke poveznice od dva ugljikova atoma s lizinom i potom s dipeptidom.
  - 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoza dobivena je regio- i stereoselektivnom deacetilacijom 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-manopiranoze uz pomoć cinkovog acetata dihidrata te je potom stereospecifičnom reakcijom nukleofilne supstitucije vezana na poveznicu od dva ugljikova atoma funkcionaliziranu karboksilnom skupinom.
  - Dimanozilirani lizin dobiven je konjugacijom karboksilnih skupina *O*-manozida s  $\alpha$ - i  $\epsilon$ - amino-skupinama L-lizina, a korištenjem EDC/HOBt karbodiimidne metode.
  - Dimanozilirana aminokiselina vezana je na desmuramildipeptid, L-alanil-D-izoglutamin-OBn također karbodiimidnom metodom. Nakon kondenzacije uklonjene su zaštitne skupine (Bn zaštita hidrogenolizom, te acetatne zaštite pomoću Zemplenove metode) te je dobivena ciljna molekula (2*S*)-2,6-di[2-( $\alpha$ -D-manopiranoziloksi)acetilamino]heksanoil-L-alanil-D-izoglutamin **10**.
  - Struktura ciljne molekule, kao i svih međuprodukata u pojedinim reakcijskim koracima, potvrđena je spektrometrijom masa te  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijama. Neki od međuprodukata dodatno su potvrđeni i IR spektroskopijom.
- Prisutnost manoznih skupina omogućava interakciju glikokonjugata s manoznim receptorima ekspimiranima na makrofagima, odnosno omogućuje ciljanu dostavu aktivnih tvari do imunokompetentnih stanica. Divalentni manokonjugati pokazuju veći afinitet prema manoznim receptorima, stoga za očekivat je da će i biološka aktivnost pripremljenog spoja biti jača od analoga sa samo jednom manoznom podjedinicom.

## **6. LITERATURNÁ VĚLA**

## 6. LITERATURNA VRELA

- [1] C. Ogawa, Y. - J. Liu, K. S. Kobayashi, *Curr Bioact Compd.* (2011) 180–197
- [2] J. Hmaun, L. L. Lenz, *J. Innate. Immun.* **1** (2009) 88–97
- [3] K. Dzierzbicka, A. Wardowska, P. Trzonkowski, *Curr. Med. Chem.* **18** (2011) 2438–2451
- [4] R. Ribić, S. Tomić, *Kem. Ind.* **62** (2013) 19–31
- [5] M.W. Turner, *Mol. Immunol.* **40** (2003) 423–429
- [6] A. Štimac, S. Šegota, M. Dutour Sikirić, R. Ribić, L. Frkanec, V. Svetličić, S. Tomić, B. Vranešić, R. Frkanec, *BBA-Biomembranes* **1818** (2012) 2252–2259
- [7] L. Martinez-Pomares, *J. Leuk. Biol.* **92** (2012) 1177–1186
- [8] R. Ribić, L. Habjanec, R. Frkanec, B. Vranešić, S. Tomić, *Chem. Biodiv.* **9** (2012) 1373–1381
- [9] S. Ukić; T.Bolanča (ur.), *Knjiga sažetaka*, XXIV. Hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera Zagreb 2015., pp. 136–136
- [10] D. E. Levy, P. Fügedi, *The Organic Chemistry of Sugars*, CRC Press Taylor & Francis Group, 2006.
- [11] A. T. Carmona, A. J. Moreno-Vargas, I. Robina, *Curr. Org. Synth.* **5** (2008) 81–116
- [12] M. Brito-Arias, *Synthesis and Characterization of Glycosides*, Springer Science+Business Media, New York, 2007., pp. 43–134
- [13] P. J. Kocienski, *Protecting Groups*, 3<sup>rd</sup> Edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005., pp. 187–333
- [14] T. K. Lindhorst, *Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> Edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., Weinheim, 2002., pp. 15–118
- [15] X. U. Guo, S. Ye, *Molecules* **15** (2010) 7235–7265
- [16] E. Kaya, F. Sonmez, M. Kucukislamoglu, M. Nebioglu, *Chemical Papers* **66** (2012) 312–315
- [17] H. G. Garg, M. K. Cowman, C. A. Hales, *Carbohydrate Chemistry, Biology and Medical Applications*, 1<sup>st</sup> Edition, Elsevier Ltd., Oxford, 2008., pp. 59–83
- [18] J. M. Berg, J. Tymoczko, L. Stryer, *Biokemija*, 1. izdanje, Školska knjiga, Zagreb, 2013., pp. 91–93
- [19] A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **109** (2009) 2455–2504
- [20] A. V. Hopper, *Recent Developments in Polymer Research*, Nova Science Publishers, Inc., New York, 2007., pp. 193–199
- [21] M. Bodanszky, *Peptide Chemistry: A Practical Textbook*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1988., pp. 158–162
- [22] Vogel's, *Textbook of Practical Organic Chemistry*, 4th ed., Longman, 1978.
- [23] G. Jokhadze, M. Machaidze, H. Panosyan, C. C. Chu, R. Katsarava, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **18** (2007) 411–438

## **7. ŽIVOTOPIS**

## Osobni podatci

Ime i prezime: Marijo Čičak

Datum i mjesto rođenja: 21.08.1992., Vinkovci

Adresa: Bartola Kašića 63, 32 100 Vinkovci

E-mail: cicakmarijo@gmail.com

## Obrazovanje

- 2014.-2016.** Prirodoslovno-matematički fakultet, Kemijski odsjek, Sveučilište u Zagrebu  
Diplomski studij kemije – istraživački smjer, grane: analitika i organska kemija
- 2011.-2014.** Sveučilište J.J.Strossmayera Osijek, Odjel za kemiju  
Preddiplomski studij kemije  
Završni rad: „*Određivanje anionskih tenzida u čistim sustavima novim potencimetrijskim senzorom*“, mentor: doc. dr. sc. Mirela Samardžić
- 2007.-2011.** Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

## Jezici

engleski, njemački

## Sudjelovanje na projektima

- 2016.** XI. Susret mladih kemijskih inženjera 2016. god, s posterskim priopćenjem:  
„Synthesis of mannose derivatives of *O*-glycolyl desmuramylpeptides“, Marijo Čičak, Doroteja Pavić, Rosana Ribić
- Znanstveni piknik, Festival znanosti u Zagrebu
- Član volonterskog projekta Studentske sekcije HKD-a s ciljem popularizacije znanosti među djecom i mladima „Znanstvene čarolije“

## **8.PRILOZI**

## 8. PRILOZI

### 8.1. POPIS KRATICA I SIMBOLA

Ala – alanin

Boc – *tert*-butoksikarbonil

Bn – benzil

*t*-Bu – *tert*-butil

Cbz, Z – benziloksikarbonil

d – dublet

dd – dublet dubleta

DBU – 1,8-diazabicikloundec-7-en

DCC – *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid

DCM – diklormetan

DIBAL-H – diizobutilaluminijev hidrid

DIC – *N,N'*-diizopropilkarbodiimid

DMAP – 4-dimetilaminopiridin

DMF – dimetilformamid

EDC·HCl – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid hidroklorid

ESI-MS – spektrometrija masa uz elektroraspršenje kao način ionizacije

Et<sub>3</sub>N – trietilamin

EtOAc – etil-acetat

EtOH – etanol

Fm – 9-fluorenilmetil

Fmoc – 9-fluorenilmetoksikarbonil

GlcNAc – *N*-acetilglukozamin

Gln – glutamin

HOAc – octena kiselina

HOBt – 1-hidroksibenzotriazol

HOSu – *N*-hidroksisukcinimid



*iso*Gln – izoglutamin

m – multiplet

MDP – muramil-dipeptid

MeOH – metanol

MR – manozni receptor

MS – spektrometrija masa

MurNAc – *N*-acetilmuraminska kiselina

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

PSI – engl. *pound-force per square inch*

pt – pseudotriplet

*p*-TsOH – *p*-toluensulfonska kiselina

q – kvartet

$R_f$  – faktor zaostajanja

s – singlet

t – triplet

TFA – trifluoroctena kiselina

THF – tetrahidrofuran

TLC – engl. *thin-layer chromatography*

TMSOTf – trimetilsilil-trifluormetansulfonat